Über die hydrophilen Inhaltsstoffe von Safran und anderen Crocus-Sorten

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von
Klaus Wagner, Apotheker
Saarbrücken

Saarbrücken 1969

Über die hydrophilen Inhaltsstoffe von Safran und anderen Crocus-Sorten

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von
Klaus Wagner, Apotheker
Saarbrücken

Saarbrücken 1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 6. März 1969

Der Dekan: Prof.Dr.H.-D. Dietze

Berichterstatter: Prof.Dr.E. Stahl

Prof.Dr.H.-J. Bielig

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof.Dr. Egon Stahl,

möchte ich für zahlreiche Anregungen und Ratschläge sowie für sein Verständnis während dieser Zeit danken.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof.Dr.H.-J.Bielig, Institut für Biochemie, für sein Entgegenkommen, an seinem Institut enzymatische Versuche ausführen zu dürfen.

Seite

Inhaltsübersicht

Einleitung und Problemstellung 1

A. Allgemeiner Teil 3

1) Zur Geschichte des Safrancrocus 3

2) Verfälschungen der Droge 4

I. Zur Botanik 4

1) Taxonomie der Gattung Crocus 4

2) Zur Polyploidie der Gattung Crocus 5

3) Morphologie 7

a) Die Gesamtpflanze 7

b) Die Narbe 7

II. Therapeutische Anwendung und Toxikologie 7

1) Offizinelle Arzneibuch-Drogen und Zubereitungen, die Safran enthalten 9

III. Zur Chemie der Carotine 10

1) Farbige, lipophile Carotin-Kohlenwasserstoffe und Carotinoide aus Crocus sativus L. 12

2) Inhaltsstoffe mit Glykosid-Charakter 13

a) Crocin, der Di-Gentiobioseester des Crocetins 13

b) Picrocrocin, "Safranbitter", 4-[ß-D-Glucopyranosido]-2.6.6-trimethyl-cyclohexen-(1)-al-(1) 15

3) Wasserdampf-flüchtige Spaltprodukte, die aus Picrocrocin entstehen 16

4) Die KUHNsche Theorie zur Entstehung des Crocins und Picrocrocins 17

B. Spezieller Teil 19

I. Exkursion in das spanische Safran-Anbaugebiet bei Albacete 19

1) Anbau und Ernte 19

2) Trocknung 22

3) Klassifizierung 23

4) Der Export 25

5) Versuche, Protocrocin in frischen Narbenschenkeln nachzuweisen 25a

II. Anbau verschiedener, handelsüblicher Frühjahrs- und Herbstcrocusse 26

III. Zur Isolierung der Safran-Inhaltsstoffe 26

1) Gewinnung durch Perkolation 27

a) Lipophile Substanzen 28

Seite

α) Wasserdampfdestillation des Perkolats 29

ß) Wasserdampfdestillation der Droge in neutralem Milieu 30

γ) Wasserdampfdestillation der Droge in saurem Milieu 31

b) Hydrophile Substanzen 33

α) Picrocrocin 33

ß) Crocin 33

IV. Diskussion der Spektren 35

1) IR-Spektren von Picrocrocin, ß-Hydroxycyclocitral und Safranal 35

2) Remissionsspektren von Crocin, Picrocrocin, ß-Hydroxycyclocitral und Safranal 37

V. Versuche zur thermischen Spaltung des Picrocrocins 39

1) Auftrageversuche des trans-Crocetindimethylesters mit dem TAS-Ofen 42

VI. Chromatographische Methoden 43

1) Dünnschicht-Chromatographie 43

a) Nachweismethoden 44

2) Arbeitsanweisung zur Prüfung von Safran auf Identität 45

3) Präparative DC 45

a) Picrocrocin 45

b) Crocin 46

4) Säulenchromatographie 47

a) Picrocrocin 47

b) Reinigung von präparativ gewonnenem Crocetin 47

VII. dc-Untersuchungen an heimischen Crocus-Sorten 47

VIII. Zur Kennzeichnung neuer, Crocin-ähnlicher Stoffe. 51

1) Das Aglykon Crocetin 53

2) Die Zucker 54

IX. Enzymatische Methoden 57

1) Spezifischer Nachweis von ß-D-Glucose auf dem DC .. 57

2) Enzymatische Spaltung von Crocin und Kohlenhydraten 59

a) Spaltung der Crocine mit Esterase P 62

α) Erneute Spaltung der wäßrigen Phasen zur Identifizierung der Zuckerkomponenten 65

X. Verteilung der Crocine in heimischen Crocus-Sorten . 67

Seite

XI. Quantitative Erfassung von Crocin und Picrocrocin im Safran 69

1) Quantitative Bestimmung der Zucker in Crocin und Picrocrocin 74

XII. Vorkommen von Saponinen in verschiedenen Crocus-Sorten 75

XIII. Weitere Untersuchungen auf Alkaloide in C.sativus L. 79

C. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse 80

D. Experimenteller Teil 83

E. Literaturverzeichnis 93

Einleitung und Problemstellung

Bei der Droge Safran handelt es sich um die roten bis dunkelrotbraunen, aromatisch riechenden Narbenschenkel von Crocus sativus L., einer Iridaceae.

Der für die intensiv rote bis dunkel-rotbraune Farbe verantwortliche Stoff wurde bereits 1771 erstmals von SOERENS [56] näher untersucht. Er trennte den natürlichen Safranfarbstoff in eine wasserunlösliche gelbe und eine wasserlösliche rote Komponente. Letztere wurde von ASCHOFF [1] 1818 Crocin genannt. Er erkannte bereits die glykosidische Natur der Substanz und erhielt durch saure Hydrolyse einen farblosen Zuckeranteil, die sog."Crocose", sowie ein dunkelrotes Aglykon unbekannter Zusammensetzung, das Crocetin. Die Befunde wurden später von WEISS [74] bestätigt, der außerdem im Hydrolysat die Glucose nachweisen konnte. Erst 90 Jahre später wurde von DECKER [12] das Crocetin kristallin als rotes Kaliumsalz erhalten. Er versuchte bereits einen Zusammenhang zwischen dem roten Farbstoff und dem Geruchsstoff, einem ätherischen Öl, damals Safranal genannt, herzustellen. Wesentlich später griff KUHN [37] mit seiner Protocrocin-Hypothese auf diese Gedankengänge zurück.- Danach soll nämlich das bereits 1884 von KAYSER [31] isolierte Picrocrocin neben Crocin aus dem hypothetischen Protocrocin entstehen. Nach einer längeren Pause begann man sich in den zwanziger Jahren in den Arbeitskreisen von KARRER [30] und KUHN [36] erneut mit den Safraninhaltsstoffen zu beschäftigen.

Im Zuge dieser eingehenden Untersuchungen gelang es KARRER und MIKI [30], den Zuckeranteil des Crocins als Gentiobiose zu identifizieren. Entgegen früheren Befunden konnte die in 1-Stellung befindliche funktionelle Gruppe des Picrocrocins als Aldehydgruppe erkannt werden, während man zuvor der Meinung war, daß eine Ketogruppe im Molekül vorliege.

Zur Auftrennung der Carotin-Kohlenwasserstoffe wurde damals von KUHN und WINTERSTEIN [37] erstmals mit großem Erfolg die TSWETTsche Säulenchromatographie an Aluminiumoxid eingesetzt. Sie ermöglichte es ihnen, Trennungen in dieser Stoffgruppe zu erhalten und unmittelbar zu verfolgen. Sie konnten auch die Leistungsfähigkeit der Chromatographie gegenüber den bisher angewendeten klassischen chemischen Trennmethoden anschaulich demonstrieren.

Eine ganze Reihe von Fragen mußte noch offen bleiben, so daß eine erneute Untersuchung des Safrans mit den inzwischen verbesserten Methoden weitere Ergebnisse erwarten ließ.

Dabei waren zunächst die älteren Befunde nachzuarbeiten, um die entsprechenden Vergleichssubstanzen zu erhalten. Im einzelnen ergaben sich zunächst folgende Fragestellungen:

1) Kommen Crocin und Picrocrocin in den Narbenschenkeln der heimischen Crocus-Sorten vor?

2) Gelingt es, mit empfindlicheren Methoden das von KUHN [37] postulierte Protocrocin eventuell in frischem Pflanzenmaterial zu finden?

3) Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Polyploidie-Grad der verschiedenen Crocus-Sorten und den charakteristischen Inhaltsstoffen, wie er beim Kalmus [64a] gefunden wurde?

Durch das Ineinandergreifen von chemischen und botanischen Fragestellungen war es angezeigt, sich auch mit botanisch-taxonomischen Gegebenheiten zu beschäftigen.

A. Allgemeiner Teil

1) Zur Geschichte des Safrancrocus

Zu den ältesten, arzneilich verwendeten Pflanzen zählt der Safrancrocus. Die ursprüngliche Heimat ist nicht mehr genau zu bestimmen, doch kommen hier wohl Griechenland und Kleinasien in Frage. Seit dem Jahre 1550 v.Chr. [47] kann man über den Safrancrocus und seine zu dieser Zeit vielseitige Verwendung Angaben finden. Eine umfassende Zusammenstellung der Geschichte dieser Pflanze sowie die medizinische Bedeutung während verschiedener Kulturepochen bei alten Völkern, besonders in ihren Religionen, findet man bei TSCHIRCH [69] und ausführlich in der Dissertation von RUEGG [53].

Im Rahmen dieser Arbeit kann nur ein kurzer Überblick über die Mannigfaltigkeit der Anwendung gegeben werden. Der Crocus diente im alten Rom nicht nur als Arzneimittel, sondern war auch Färbemittel für Stoffe; galten doch damals Safran-gefärbte Kleidungsstücke als besonders vornehm. Auf Grund seines stark aromatischen Geruches diente er ferner als Räuchermittel bei religiösen Kulthandlungen. Zu diesem Zweck wird Safran heute noch aus Spanien nach Indien exportiert. In der Kosmetik hatten früher Safran-gefärbte Tinkturen und Salben ihren festen Platz. Während bei den Arabern und Persern der Safran eine magische Bedeutung hatte, wurde er von den Römern bevorzugt wegen seines angenehmen, betäubenden Duftes und seiner angeblich erotisierenden Wirkung als Füllung für Kissen verwendet.

Auf Grund ihrer zahlreichen Anwendungen wurde diese Pflanze sehr früh in Kultur genommen. Die ersten Safran-Kulturen haben Griechenland, Kleinasien, Sizilien und Italien angelegt. Im zehnten Jahrhundert brachten dann die Araber den Safrancrocus nach Spanien, wo auch heute noch die größten Anbaugebiete liegen. Versuche, im späten Mittelalter den Safrancrocus in Mittel- und Westeuropa anzubauen, waren zahlreich, jedoch nicht von langer Dauer. Seit der Safrancrocus in Spanien angebaut wird, haben alle anderen Anbauzentren ihre Bedeutung verloren. In neuester Zeit scheinen Versuche, ihn auf dem indischen Subkontinent in

größerem Maßstab zu kultivieren, erfolgreich zu sein [9]. Eine der Hauptabnehmer des spanischen Safrans ist heute Frankreich, das ihn in seiner Küche vorzugsweise verwendet zu Safranreis o zur "Bouillabaisse" [14], einer Fischsuppe mit Safran.

Im Mittelalter war Venedig (Officio del Zaffarano) für den Safranhandel von Bedeutung. In Deutschland wurde der Handel vi fach unter landesherrschaftliche Aufsicht gestellt und eine Ei teilung in Güteklassen vorgenommen. Dies war schon deshalb not wendig, weil die Versuche, die Droge zu verfälschen, so alt si wie der Safrananbau und -handel selbst.

2) Verfälschungen der Droge

Vielfach wurden ähnlich aussehende und weniger wertvoll Blütenorgane anderer Pflanzen (u.a. Flores Paeoniae und Flores Calendulae) beigemischt. Weiter wurde die Droge mit Honig und Bariumsulfat beschwert. Pulverisierte Droge wurde vorzugsweise mit Ziegelmehl verschnitten. FLÜCKIGER [16] berichtet, daß um 1450 in Nürnberg Safranfälscher sogar mit dem Tode bestraft wu den. In neuerer Zeit findet man in der Literatur weitere Metho den der Safranfälschung. So fand BAYTOP [3] mit Lugolscher Lös getränkte Papierteile, die Narbenschenkel-ähnlich geschnitten waren, sowie mit Stärke verfälschtes Drogenpulver.

I. Zur Botanik

1) Taxonomie der Gattung Crocus

Nach HUTCHINSON [25] gehören die Crocus-Arten zur Unt familie der Croceae. Die Klassifizierung wurde von MAW [44] vo genommen und wird bis heute benutzt. BAILEY [2] unterscheidet zwischen Frühling- und Herbst-blühenden Arten, die wieder auf Grund morphologischer Unterschiede der einzelnen Pflanzenorgan unterteilt werden.

Die geographische Verbreitung mancher Crocus-Arten ist gut untersucht; so sind z.B. Crocus-vernus-Arten im Alpengebiet [7 verbreitet, während Crocus-sativus-Arten vorwiegend im Mittel- meergebiet und Kleinasien vorkommen.

Tabelle 1. Systematische Aufgliederung der Gattung Crocus nach BAILEY [2]

Familie:	IRIDACEAE	
Unterfamilie:	CROCEAE	
Gattung:	CROCUS	
	Frühjahrsblüher	Herbstblüher
	Art:	Art:
	Crocus imperati	Crocus salzmanii
	Crocus versicolor var. picturatus	Crocus longiflorus
	Crocus tomasinianus	Crocus zonatus
	Crocus sieberi	Crocus medius
	Crocus susianus	Crocus sativus
	Crocus aureus	Crocus speciosus
	Crocus biflorus	
	Crocus chrysanthus	
	Crocus vernus	
	Unterart:	Unterart:
	Crocus neapolitanus	Crocus pulchellus
	Crocus albiflorus	
	Crocus fritschii	

2) Zur Polyploidie der Gattung Crocus

Die in Gärten hauptsächlich im Frühjahr und Herbst blühenden Krokusse sind Kulturvarietäten, die durch Züchtung erhalten wurden. WOLKINGER [77] ist der Ansicht, daß der Name bald für einzelne, ganz verschiedene Arten, bald als Sammelbegriff für mehrere, nicht miteinander verwandte Arten verwendet wird. Deshalb ist es richtiger, in diesem Fall lediglich von Sorten zu sprechen.

Tabelle 2. Untersuchte Crocus-Sorten

Sorte	Polyploidie-Grad	Blütezeit
C. aureus Sibth et Sm.	diploid	Frühjahr
C. biflorus Mill.	diploid	Frühjahr
C. zonatus Gay.	diploid	Herbst
C. pulchellus Griseb.	diploid	Herbst
C. speciosus Aitchisoni	di- u. tetraploid	Herbst
C. sieberi Gay.	di- u. tetraploid	Herbst
C. imperati Ten.	diploid	Frühjahr
C. versicolor var. picturatus Ker-Gawl.	triploid	Frühjahr
C. sativus L.	triploid	Herbst
C. vernus "Große Gelbe"	tetraploid	Frühjahr
C. vernus "Kleine Gelbe"	?	Frühjahr
C. vernus "Jeanne d'Arc"	?	Frühjahr
C. vernus "Violett Vanguard"	?	Frühjahr
C. ancyrensis Sibth et Sm.	?	Frühjahr
C. susianus Ker-Gawl.	?	Frühjahr

Die Angaben zum Polyploidie-Grad wurden, soweit angegeben, von KARASAWA [29] übernommen.

Bis auf Crocus sativus L., der aus dem Anbaugebiet Albacete (Spanien) stammt, wurden alle Sorten im Institutsgarten kultiviert. Die Knollen wurden von der Fa. Van Tubergen, Haarlem (Holland), bezogen.

Während man früher lediglich die morphologischen Unterschiede zur Einordnung der einzelnen Crocus-Pflanzen in ihre Arten zugrunde legte, haben z.B. KARASAWA [29] und MATHER [42a] bei ihren Untersuchungen festgestellt, daß bei der Gattung Crocus die Polyploidie-Grade sehr verschieden sind. Während die heimischen Crocus-Arten meist diploid und fertil sind, ist z.B. Crocus sativus L. triploid und daher steril.

3) Morphologie

a) Die Gesamtpflanze

Die Crocuspflanze besitzt eine unterirdische Sproßknolle, die zur Blütezeit einen kurzen, im Boden verbleibenden Blütensproß bildet. An der Blütenachse entwickelt sich endständig eine einzige Blüte. Treten an der Endblüte weitere Blüten auf, dann sind diese achselständig. Der unterständige Fruchtknoten verbleibt nebst dem unteren, röhrenförmigen Perigonteil der Blüte ebenfalls im Boden und wird von 1 - 2 häutigen Hochblättern umhüllt. Der oberirdische Teil des Perigons ist radiär-symmetrisch und besteht aus 6 Blütenblättern, die in 2 Kreisen angeordnet sind. Im allgemeinen entwickeln sich die linealischen Blätter nach der Blüte.

b) Die Narbe

Charakteristisch für die verschiedenen Crocus-Arten ist die Ausbildung der Narben und der Narbenschenkel des langgestreckten Griffels. Bei der für die Drogengewinnung wichtigsten Art, Crocus sativus L., sind sie dreigeteilt, trichterförmig und so stark verlängert, daß sie über die Perigonblätter hinaushängen. Ihre Farbe ist rot bis dunkel-rotbraun.

Bei den heimischen Arten und Kulturvarietäten sind die Narbenschenkel kleiner, die Dreiteilung ist weniger ausgeprägt, z. B. bei Crocus imperati. Statt dessen sind die trichterförmigen Enden der Narbenschenkel stark aufgegliedert; ihre Farbe ist gelb bis orange.

II. Therapeutische Anwendung und Toxikologie

Die bisher bekannten therapeutischen und toxischen Angaben über den Safran sind sehr unterschiedlich. Die Droge wurde seit DIOSCORIDES [13] in arzneilichen Zubereitungen gegen eine Vielzahl von Krankheiten verwendet. Bei den Literaturangaben über den Safran ist der Hauptanwendungsbereich bei Erkrankungen des Magen- und Darmtraktes zu finden; dies kann eventuell auf die Bitterstoffwirkung der Droge zurückzuführen sein.

> Nach HAUSCHILD und GÖRISCH [21] führen bitter schmeckende Stoffe, ganz gleich welcher chemischen Zusammensetzung, zu einer vermehrten Magensaftsekretion, außerdem wirken sie appetitfördernd. Dieser Effekt kommt bei Mensch und Tier reflektorisch über die Geschmacksnerven zustande; er ist jedoch kein bedingter Reflex.

Bitterstoffe werden auch heute vielfach zur Bereitung von tonisch wirkenden Arzneimitteln verwendet. In der Volksmedizin wird der Safran seit langem als Abortivum verwendet; in der Regel werden Aufkochungen von 10 g in 100 - 200 ml Wasser bereitet und schnell getrunken. Das ätherische Öl soll bei dieser Zubereitung wohl die glatte Muskulatur des Uterus beeinflussen [6,10]. LEWIN [40] beschreibt mehrere, durch Safran hervorgerufene Aborte. Er zeichnet das Krankheitsbild nach der Einnahme von Safran so, daß Schmerzen im Leib, allgemeine Mattigkeit, "Eingenommensein", Kopfweh, Schwindel, Delirien, seltener jedoch Uterus-Blutungen von mehrtägiger Dauer aufgetreten seien. Bei seinen Beobachtungen beschränkte er sich lediglich auf die äußeren Symptome.

FRANK [17] konnte am Krankheitsbild einer 28jährigen Frau, die zu abortiven Zwecken eine Abkochung von ca. 5 g Safran in Milch sowie 20 Cyren-B^{R}-Tabletten, welche als wirksame Substanz 0.25 mg Diäthylstilböstrolpropionat pro Tablette enthalten, zu sich genommen hatte, neben der erfolgten Abtreibung folgende Nebenwirkungen feststellen:

> Ein Kreislaufkollaps infolge starker Blutdrucksenkung und Tachykardie sowie Blutungen im Bereich der Nasenscheidewand. Weiter zeigten sich schwere urämische Erscheinungen und Zerstörungen an den Wänden präkapillarer und kapillarer Gefäße.

Am Beispiel dieser Untersuchungen wird deutlich, welche schweren Nebenwirkungen Safran-Inhaltsstoffe im menschlichen Organismus, insbesondere auf die Nierenfunktion, ausüben können. Werden nämlich Cyren-B-Tabletten allein genommen, zeigen sich diese Erscheinungen nicht.

Betrachtet man die eingenommene Drogenmenge von 5 g im Hinblick auf die Inhaltsstoffe, so kann man davon ausgehen, daß günstigstenfalls 0.3 - 0.6 g Picrocrocin und 0.5 - 1 g Crocin

in den Organismus gelangt sind. Es ist anzunehmen, daß jedoch nur das Picrocrocin eine derart starke Reizwirkung aufweist. Daß Picrocrocin oder seine Spaltprodukte (ß-Hydroxycyclocitral und ß-Dehydroxycyclocitral) einen artefiziellen Abort hervorrufen, erscheint möglich. Allerdings findet man auch Literaturangaben, nach denen Abkochungen von 15 g Safran nicht zu einem Abort führten. Eine Erklärung für diese unterschiedliche Wirkung kann in dem differierenden Gehalt der Droge an Picrocrocin liegen, wie später (S. 72) gezeigt wird.

Das ätherische Öl kommt in der Droge genuin nur in Mengen unter 0.05 % vor, und es ist nach seinen Bestandteilen kaum anzunehmen, daß es für die abortive Wirkung verantwortlich ist. Ob dem Carotinglykosid Crocin eine derart toxische Wirkung zukommt, bleibt ebenfalls zu untersuchen; sie ist aber wenig wahrscheinlich. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß LEWIN [40] bei einer Frau nach einem mit Safran verursachten Abort einen Fötus von gelber Farbe gesehen hat.

BRAUN [7] teilt die Meinung französischer Autoren, daß das aus dem Picrocrocin entstehende "ätherische Öl" über die Lunge ausgeschieden wird und durch Anästhesierung der alveolaren und bronchialen Vagus-Endigungen als Hustenmittel dienen kann.

SCHINDLER [54] erwähnt, daß Crocus in der Homöopathie bei wechselnden Gemütszuständen, der Zyklothenie, als "Frauenmittel" und bei chronisch-krankhaften Zuckungen, dem "Tic nerveux" der Augenlider Anwendung findet.

1) Offizinelle Arzneibuch-Drogen und Zubereitungen, die Safran enthalten

Das Homöopathische Arzneibuch (HAB)*) verwendet die Narbenschenkel zur Bereitung der Urtinktur. Im DAB 6 werden Stigmata Croci, Tinktura Croci und Tinktura Opii crocata aufgeführt.

*) Homöopathisches Arzneibuch, 2.Aufl., Verlag Dr.W.Schwabe, Berlin 1950, S.177

Im DAB 7 der BRD sind Safran und seine Zubereitungen nicht mehr enthalten.

Im Vergleich mit einigen anderen Pharmakopöen wird nur von der Pharmacopée Française VIII^{e} Edition der Safran als Droge, eine Safrantinktur und eine Safran-haltige Opiumtinktur genannt.

III. Zur Chemie der Carotine

WACKENRODER [72] isolierte 1831 aus Karotten (Gelbe Rüben, Möhren) einen roten Farbstoff, den er Carotin nannte. Damit gab er einer Reihe ähnlich gebauter, Stickstoff-freier Polyenverbindungen den Namen. In Anlehnung daran nannte TSWETT [70] farbige Verbindungen gleichartiger chemischer Struktur "Carotinoide"; sie sind, von wenigen Ausnahmen abgesehen, fettlöslich. Daher wurden sie früher auch von KRUKENBERG [32] "Lipochrome" genannt. Carotinkohlenwasserstoffe und Carotinoide sind zumeist gut kristallisierende Verbindungen; ihre Schmelzpunkte liegen zwischen 100 - 285°. Die all-trans-Verbindungen schmelzen etwas höher gegenüber den entsprechenden cis-Verbindungen. Eine Beziehung zwischen der Höhe des Schmelzpunktes und der Anzahl der cis-Doppelbindungen besteht nicht.

Im Hinblick auf die Identifizierung sind die Schmelzpunkte mit einer gewissen Vorsicht zu betrachten, da sich während des Aufheizvorganges cis-Isomere in die höherschmelzende all-trans-Form umwandeln können und so das Phänomen des doppelten Schmelzpunktes zeigen [79].

Weitaus genauere Auskunft über die Konstitution kann man an Hand von Absorptionsspektren geben. Sie zeigen meist 3 Maxima im Bereich zwischen 400 und 580 nm. Danach läßt sich sagen, ob es sich um die all-trans- oder eine der möglichen cis-Verbindungen handelt. Die Anwesenheit von cis-Bindungen ergibt im langwelligen UV-Bereich Absorptionsmaxima, die zwischen 320 - 360 nm liegen.

Die Polyenverbindungen werden in unsymmetrische und symmetrische Verbindungen eingeteilt; bei den ersteren sind die beiden Hälften des Moleküls verschieden, bei den letzteren jedoch gleich. Enthält ein konjugiertes System n aliphatische Doppel-

bindungen, so ist die Anzahl der möglichen Stereoisomeren N gleich:

a) für unsymmetrische Systeme

$$N = 2^n,$$

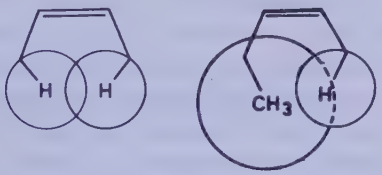
b) für symmetrische Systeme, n ungerade

$$N = 2^{(n-1)/2} \cdot (2^{(n-1)/2} + 1),$$

c) für symmetrische Systeme, n gerade

$$N = 2^{(n/2)-1} \cdot (2^{(n/2)} + 1).$$

Weiter gibt es bei Carotinoiden zwei Arten von Doppelbindungen im konjugierten System, nämlich behinderte und unbehinderte [48].



Der Effekt des "Überlappens" beeinflußt das Absorptionsspektrum ebenso wie

1) die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen,
2) die Art und Anzahl der funktionellen Gruppen,
3) die Konfiguration und
4) das Lösungsmittel.

Die Untersuchungen über die geometrische Isomerisation der Carotinoide wurden schon 1923 von HERZIG und FALTIS [22] am

cis-Bixin ausgeführt. KUHN und WINTERSTEIN [36, 37] fanden im Falle des Crocin-Spaltproduktes, dem Crocetin, ebenfalls cis-trans-Isomerieerscheinungen.

Weitere Aufschlüsse über die Konstitution geben die IR-Spektren; hier sind die Arbeiten von YAMAGUCHI [78], WARREN und WEEDON [73] und LIAAEN und SÖRENSEN [41] zu erwähnen.

Mit der Anwendung der Säulenchromatographie zur Trennung und Identifizierung von Substanzgemischen ähnlicher chemischer Konstitution müssen die Arbeiten von GILLAM und Mitarbeitern [18] Erwähnugg finden, die eine systematische Untersuchung von cis-trans-Isomerieerscheinungen von C_{40}-Carotinoiden an Aluminiumoxid-Säulen durchführten.

Die chromatographische Adsorption erlaubt ebenfalls gewisse Aussagen über die Struktur der Verbindung, z.B. über deren funktionelle Gruppen. Bei Verwendung gleicher Sorptions- und Lösungsmittel besteht eine Abhängigkeit zwischen Adsorptionsaffinität und Konstitution des Carotinoids. Bei gleicher Anzahl konjugierter Doppelbindungen wird dasjenige Carotinoid stärker absorbiert, welches

1) über die größere Anzahl von OH-Gruppen verfügt,
2) mehr C=O-Gruppen besitzt,
3) mehr Estergruppierungen hat und
4) in dessen Molekül sich noch weitere Doppelbindungen befinden, die unabhängig vom konjugierten System sind [8, 80].

Nach Bolliger [4] können Isomerengemische adsorptiv am besten getrennt werden, doch muß die geeignete Trennanordnung jeweils gesucht werden, da sich hierfür keine gültigen Regeln aufstellen lassen.

1) Farbige, lipophile Carotin-Kohlenwasserstoffe und Carotinoide aus Crocus sativus L.

Im Safrancrocus sind eine Reihe von Carotinen enthalten. KUHN und WINTERSTEIN [37] haben vor über 30 Jahren folgende Carotin-Kohlenwasserstoffe und Carotinoide isoliert (Tab.3, S. 13):

Tabelle 3. Carotin-Kohlenwasserstoffe und Carotinoide aus Crocus sativus L. nach KUHN und WINTERSTEIN [37]

Substanz	Summenformel	Fp.(korr.) (°C)	λ_{max} (CS_2)	Farbe	Kristall-Form
Lycopin	$C_{40}H_{56}$	174-175	477, 507, 548	dunkel-rot	Prismen
ß-Carotin	$C_{40}H_{56}$	183	450, 485, 520	dunkel-violett	Prismen
α-Carotin	$C_{40}H_{56}$	187-188	477, 509	violett	Prismen
γ-Carotin	$C_{40}H_{56}$	156.5	463, 496, 533	dunkel-rot	Prismen
Zeaxanthin	$C_{40}H_{56}O_2$	215.5	450, 483, 518	gelb	Prismen
Crocetin	$C_{20}H_{24}O_4$	285	426, 453, 482	ziegel-rot	Rhomben

2) Inhaltsstoffe mit Glykosid-Charakter

Nach dem heutigen Stand der Forschung auf dem Gebiet der hydrophilen, farbigen Pflanzen-Inhaltsstoffe gehört Crocus sativus L. zu den wenigen Pflanzen, die neben einer Anzahl lipophiler Carotinoide ein wasserlösliches Carotinoidglykosid, das Crocin, besitzt.

a) Crocin, der Di-gentiobioseester des Crocetins (Gardenin, Nyctanthin)

(Daten auf S. 14)

Summenformel: $C_{44}H_{64}O_{24}$

Molekulargewicht: 976.99

Fp.: 186°

$[\alpha]_{Cd}^{20}$: +1760 ± 40° (c = 0.106, Wasser)[34]

Absorptionsmaxima: 432 und 463 nm in Methanol

Substanz: kristallin, dunkelviolett (aus Äthanol)

Löslichkeit: gut löslich in Wasser, Methanol und 70proz. Äthanol

Geruch: kein

Geschmack: süßlich

Pharmakologische Wirkung: Therapeutische und toxische Wirkungen sind nicht bekannt.

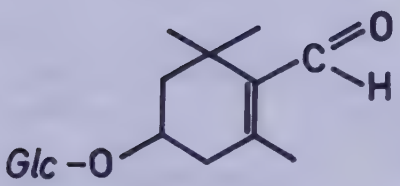
Nach KUHN und MOEWUS [35] soll das Crocin der Beweglichkeitsstoff für Gameten der Grünalge Chlamydomonas eugametos sein; dies ist jedoch unrichtig, wie später HARTMANN [20] zeigte.

Das Vorkommen von Crocin ist nicht nur auf die Narbenschenkel von Crocus sativus L. beschränkt, es wurde in zumeist geringen Mengen auch in Organen anderer Pflanzen gefunden.

So enthalten die Blütenblätter von
Verbascum phlomoides L. (Scrophulariaceae) ca. 0.03% [55],
Cedrela toona Roxb. (Meliaceae) 1.0% [49]
sowie von Nyctanthes arbor-tristis L.(Oleaceae) ca.0.09%[23] und von Crocus vernus var. luteus Crocin [15]. In den Früchten von Gardenia grandiflora Lour., einer Rubiaceae, konnten ROCHLEDER und MAYER [52] 1.5% Crocin nachweisen.

Unterwirft man Crocin einer sauren, alkalischen oder ammoniakalischen Hydrolyse, so erhält man je nach Versuchsbedingungen entweder das Aglykon Crocetin, eine Carotinoid-dicarbonsäure, oder die Mono- und Di-ester. Bei saurer Spaltung findet man im Hydrolysat an Zuckern nur die Glucose, bei alkalischer oder ammoniakalischer Hydrolyse das Disaccharid Gentiobiose.

b) Picrocrocin, "Safranbitter", 4-[ß-D-Glucopyranosido]-2.6.6-trimethyl-cyclohexen-(1)-al-(1)



Summenformel: $C_{16}H_{26}O_7$

Molekulargewicht: 330.4

Fp.: 156°

$[\alpha]_D^{20}$: -87° (96proz.Äthanol)

Geruch: kein

Geschmack: erst süß, dann bitter

Substanz: gelblich-weiße Prismen

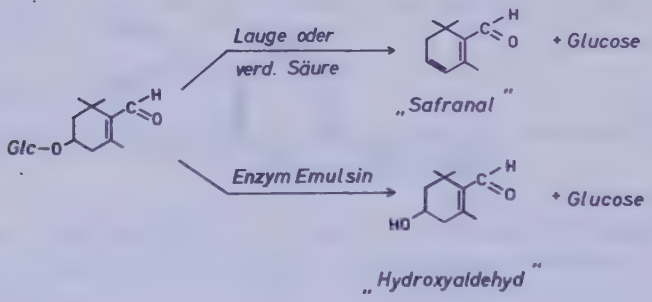
Löslichkeit: gut löslich in Wasser, Methanol und 70proz. Äthanol

Der Bitterstoff Picrocrocin wurde schon von KAYSER [31] 1884 beschrieben; die Reindarstellung gelang jedoch erst WINTERSTEIN und TELECZKY [76]. Beide Autoren waren der Meinung, daß es sich bei dem Aglykon um ein Keton handle.

KUHN und WINTERSTEIN [37] haben jedoch dann gezeigt, daß Picrocrocin ein Terpenaldehyd ist, der mit ß-D-Glucose veräthert ist.

3) Wasserdampf-flüchtige Spaltprodukte, die aus Picrocrocin entstehen

Das Glucosid Picrocrocin und die beiden Bestandteile des ätherischen Safranöls, ß-Hydroxycyclocitral und ß-Dehydroxycyclocitral (= Safranal) sind nach Herkunft und Konstitution verwandte Substanzen, deren Entstehung vom Picrocrocin abgeleitet werden kann:



KUHN und Mitarbeiter [37] haben zur Konstitutionsaufklärung des Picrocrocins dieses der Wasserdampfdestillation in saurem Milieu unterworfen und dabei das schon bekannte "Safranal" erhalten. Um festzustellen, ob Picrocrocin direkt in Safranal und Glucose zerfällt, oder ob hydrolytische Spaltung (unter Wasseraufnahme) und Bildung eines Hydroxyaldehyds als Zwischenprodukt stattfindet, wurde die Kinetik dieses "Zerfalls" [33] unter dem Einfluß von Lauge und verdünnter Säure eingehend untersucht. Die Autoren stellten fest, daß

> "... es ungewöhnlich ist, daß ein Glucosid sowohl durch Säure als auch durch Lauge so glatt gespalten wird und daß dabei ein Aglukon und eine neue Doppelbindung auftritt ..."

Dazu wurden von KUHN und LÖW [33] polarimetrische Messungen in 50proz. Äthanol nach Zugabe berechneter Säure- oder Alkalimengen ausgeführt und die Drehungsänderungen in der Zeiteinheit bestimmt. Auf diese Weise konnte das intermediär als Zwischenprodukt vermutete ß-Hydroxycyclocitral beim "Zerfall" von Picrocrocin unter

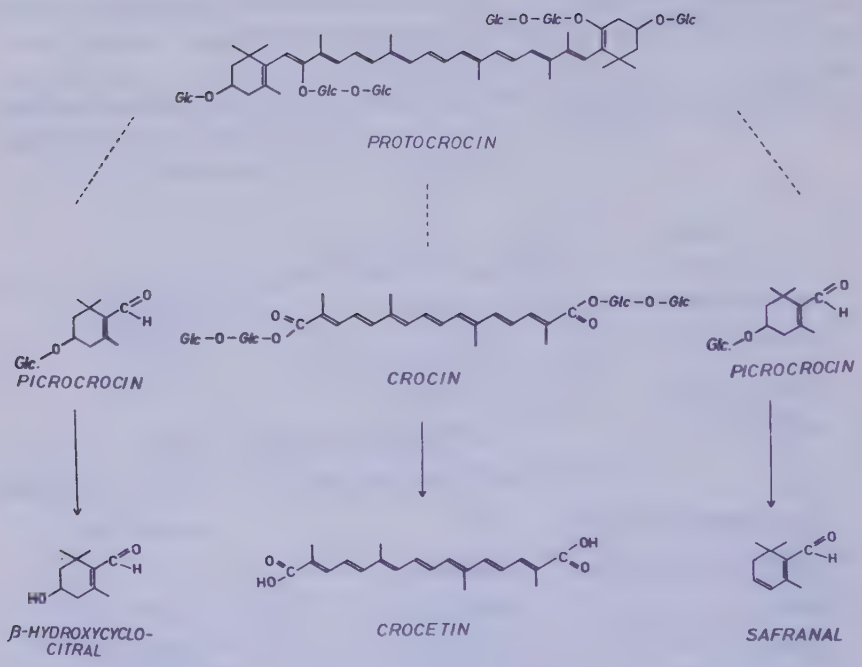
der Einwirkung von Lauge oder Säure ausgeschlossen werden. Es entstand jedoch beim Inkubieren einer wäßrigen Picrocrocin-Lösung mit Emulsin. Vergleichende Daten über das physikalische und chemische Verhalten von ß-Hydroxycyclocitral und ß-Dehydroxycyclocitral sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4. Daten und Verhalten von 4-Hydroxy-2.6.6-trimethyl-cyclohexen-(1)-aldehyd-(1) [A] und 2.6.6-Trimethyl-cyclohexadien-(1.3)-aldehyd-(1) [B]

	A	B
Summenformel	$C_{10}H_{16}O_2$	$C_{10}H_{14}O$
Molekulargewicht	168.1	150.2
$Sdp._{0.001}$	80 - 90°	85 - 87°
$[\alpha]_D^{20}$	-87°(90proz.Äthanol)	-58°
λ_{max}	245.5nm (Methanol)	249.5 nm(Methanol)
Löslichkeit(Wasser)	gut	unlöslich
H_2O-Dampf-flüchtig	schwer	gut
Fp.	191°	191°
Geruch	blumig	streng
Geschmack	bitter	bitter
Farbe	gelblich	gelblich-grün

4) Die KUHNsche Theorie zur Entstehung des Crocins und Picrocrocins

Anhand der genannten Inhaltsstoffe hat KUHN [37] einen biogenetischen Zusammenhang vermutet und angenommen, daß die beiden Glykoside aus einer gemeinsamen Vorstufe, dem Protocrocin, entstanden sein können (Schema auf S.18).



Nach der oben stehenden hypothetischen Formel soll das Protocrocin etwa die gleiche Farbe wie Crocin aufweisen und sich auch im chromatographischen Verhalten entsprechend einordnen und nachweisen lassen.

Auf der Suche nach dem Protocrocin war es im Rahmen dieser Arbeit sinnvoll, die Untersuchungen an frischem Pflanzenmaterial auszuführen, um Artefakte zu vermeiden.

B. Spezieller Teil

I. Exkursion in das spanische Safran-Anbaugebiet bei Albacete

Um den heutigen Stand des Crocus-Anbaus, der Ernte, Auslese, Trocknung und des Handels zu untersuchen, wurde mit dem instituts-eigenen VW-Expeditionsbus im November 1964 eine Exkursion zur Crocus-Ernte in eines der Hauptanbaugebiete des Safrans in Spanien, nach Albacete, unternommen. Die ca. 2000 km lange Fahrt wurde zeitlich so geplant, daß man in der ersten Novemberwoche zum Erntebeginn im Anbaugebiet von Albacete eintraf. In den feuchteren Flußtälern bei Cuenca beginnt die Ernte etwa 1 Woche früher.

Nach der Ankunft in Albacete stellte es sich jedoch heraus, daß in diesem Jahr die Ernte schon zeitiger begonnen hatte und bereits in vollem Gange war.– An Ort und Stelle konnten nähere Einzelheiten über die Ernte und Weiterbehandlung in Erfahrung gebracht werden, die nachfolgend zusammengestellt sind.

1) Anbau und Ernte

Crocus sativus L. ist eine widerstandsfähige Pflanze, die auf Grund der Speicherfähigkeit ihrer Zwiebel für Wasser sehr trockene Sommer überstehen kann. Im Gebiet um Albacete sind Temperaturen zwischen 30 und 35° über mehrere Wochen ohne Regen im Sommer wie auch mehrwöchige Kälteperioden bis –15° im Winter keine Seltenheit. An die Bewässerung stellt der Safran keine besonderen Anforderungen; in Spanien werden nur ungefähr 2.5% der gesamten Anbaufläche bewässert. Im Laufe einer Vegetationsperiode genügen 2 Regenzeiten für die Entwicklung, eine im März, damit sich neue Zwiebeln bilden, die andere soll Ende September vor der Blüte sein.

In den Monaten Juni bis August werden die Zwiebeln im Abstand von 8 bis 10 cm in frisch bestellten Boden ca. 20 cm tief in Reihen gesteckt, zwischen denen 10 bis 15 cm Abstand sein soll. Zuvor wird die äußere Hülle der Zwiebel entfernt, damit sich mehr Seitenknospen bilden. Für 1 ha benötigt man zwischen 40 bis 60 kg Zwiebel, die im März desselben Jahres aus einem Feld genommen

wurden, das an 5 aufeinanderfolgenden Jahren abgeerntet worden war. Wenn die Zwiebeln im Juli gesetzt sind, bleibt das Feld bis Mitte September liegen; erst kurz vor der Regenzeit wird der Boden aufgeharkt.

Bei einjährigen Pflanzen ist keine besonders gute Ernte zu erwarten. Im April des darauffolgenden Jahres werden die oberirdischen, grünen Hüllblätter abgemäht und nach dem Trocknen als Viehfutter verwendet; sie sind also nicht toxisch. Die besten Ernten liefern Felder im 3. und 4.Jahr des Anbaus.

Tabelle 5. Erträge pro Hektar an trockenen Narbenschenkeln

	Menge [kg]
1.Jahr	6 - 10
2.Jahr	12 - 15
3.Jahr	16 - 18
4.Jahr	10 - 12
5.Jahr	6 - 9

Da die Tochterknollen immer auf den Mutterknollen wachsen, gelangen sie in weniger feuchten Boden und die oberirdischen Pflanzenteile entwickeln sich schlechter; gleichzeitig nimmt die Qualität der geernteten Narbenschenkel ab. In trockenen Gebieten wartet man mit einem erneuten Crocus-Anbau auf dem gleichen Feld ca. 15 Jahre, in feuchten Gegenden 7 Jahre. In der Zwischenzeit wird das Gelände zum Getreideanbau oder als Weideland verwendet. Trotz der seit einigen Jahren vom spanischen Landwirtschaftsministerium gewährten Unterstützungen mit künstlichem Dünger bleiben bis heute viele Bauern bei der althergebrachten Anbaufolge.

Bei der Spanienfahrt fanden wir Safranfelder, die eine Größe von 5 bis 50 Ar hatten. Die Anbaufläche richtet sich meist nach der Zahl der Familienglieder, die bei der Ernte mithelfen können.

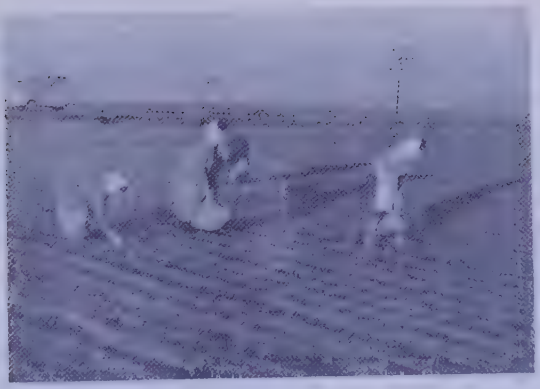


Abbildung 1
Pflücken der Blüten auf einer Safran-Kultur

Abbildung 2
Öffnen der Blüten und Entfernen der Narbenschenkel

Abbildung 3
Trocknen der frischen Narbenschenkel über verglimmender Holzkohle

Die Ernte ist mühevoll, da bis jetzt keine Maschinen dazu verwendet werden können. Das Pflücken der Blüten und das darau folgende Herauszupfen der Narbenschenkel ist nach wie vor zeit raubende Handarbeit. Die Blüten werden morgens in der Zeit zwi schen 7 bis 9 Uhr von Frauen und Kindern in große Basttaschen gepflückt. Da es um diese Zeit noch empfindlich kühl ist, blei ben die Perigonblätter geschlossen und die wertvollen Narben- schenkel gehen nicht verloren oder werden beschädigt.

In einem spanischen Lied heißt es:

	dt. Übersetzung
La rosa del azafran es	Die stolze Safranblüte wird am
una flor arrogante	Morgen bei Sonnenaufgang gebor
que nace al sahir el sol	und dann später beim Pflücken
y muere al caer la tarde.	getötet.

Mit dem Sterben des Safrans ist wohl das Pflücken und Entferne der Narbenschenkel gemeint.

Zwischen diesen beiden Arbeitsgängen soll nach Aussage von Safranbauern höchstens eine Zeit von 10 bis 12 Stunden vergehe bleiben die Narbenschenkel länger in der Pflanze, werden sie weich und schmierig und können dann nicht mehr unbeschädigt en fernt werden. Dies soll qualitätsmindernd sein.

2) Trocknung

In der älteren Literatur wird der Trocknungsvorgang oft als "Rösten" bezeichnet. Nach den von mir vorgenommenen Messun gen an Ort und Stelle übersteigt die Temperatur nie 45°. Wie e wähnt, wird die Trocknung noch am selben Tag abends nach der E te in den Häusern der Bauern so durchgeführt, daß glimmende Ho asche auf den Boden von Tonschalen, die ca. 30 bis 35 cm Durch messer haben und etwa 20 cm hoch sind, gegeben wird; darauf we den die Siebe gestellt, die fingerdick mit frischen Narbensche keln belegt sind. Mit einem zweiten, gleichgroßen Sieb wird al 10 Minuten gewendet. Nach spätestens 30 Minuten ist das Trockn beendet. Bei der Trocknung über verglimmender Kohle wird durch

Wärmeeinwirkung sowie Anwesenheit von CO_2 und CO neben einer schnellen Wasserabgabe möglicherweise auch eine Inaktivierung der Enzyme erreicht.

In den Anbaugebieten um Murcia werden die Narbenschenkel auf Tüchern ausgebreitet und an sonnigen und windgeschützten Stellen an der Luft getrocknet.

Die frisch getrocknete Droge kann fast geruchlos sein oder nur schwach aromatisch riechen. Der charakteristische Safrangeruch konnte von uns während und gleich nach der Trocknung nicht festgestellt werden.— Die Bauern verwahren die Droge nach dem Trocknen in Zeitungspapier eingeschlagen in Holzkästen kühl und trocken auf, bis sie die Ware zu den Händlern bringen. Für 100 g trockne Droge werden ca. 17 000 Blüten benötigt. Während der Trocknung werden 20 - 25% Wasser eliminiert.

3) Klassifizierung

Die Klassifizierung der Narbenschenkel, wie sie z.Zt. vom Handel in Spanien durchgeführt wird:

1) nach Glanz und Farbe in:
   a) selectos = besten,
   b) superiores = sehr guten,
   c) buenos = guten und
   d) corrientes = gewöhnlichen Safran;

2) nach Geruch in:
   a) aromáticos = aromatische,
   b) excelentes = ausgezeichnete,
   c) buenos = gute und
   d) corrientes = gewöhnlich riechende Narbenschenkel;

3) nach Länge und Stärke der Narbenschenkel in:
   a) Muy selectos = besonders ausgesuchte(die Länge der Narbenschenkel muß mindestens 53 mm und mehr betragen)
   b) selectos = ausgesuchte (bis 53 mm),
   c) superiores = gute (50-53 mm),
   d) medios = mittlere (46-50 mm),
   e) corrientes = gewöhnliche (40-46 mm) und
   f) flojos = schlechte, unter 40 mm große Ware.

Aus den auf S.23 erwähnten 3 Kriterien teilt man jetzt in 6 Handelsgruppen ein:

A) Muy selecto = sehr gut ausgewählt, d.h. die Länge der Narbenschenkel muß mindestens 53 mm und mehr betragen, die Farbe muß kräftig dunkelrot, der Geruch soll aromatisch sein.

B) selecto = ausgelesen; die Narbenschenkel sollen bis 53 mm lang, dunkelrot und von gutem Geruch sein.

C) superior = gute Qualität; die Länge soll 50 - 53 mm betragen, sie sollen aber nicht zu leicht brechen; die Farbe muß noch rot sein und der Geruch gut.

D) medio = mittlere Qualität; die Länge soll zwischen 46 bis 50 mm betragen, die Farbe soll rot und glänzend sein.

E) corriente = laufende und gewöhnliche Qualität; 40 - 46 mm lang und von angenehmem Geruch.

F) flojo = schlechte Qualität, unter 40 mm lang. In dieser Gruppe sind auch die Narbenschenkel enthalten, die zwar länger sind, aber die an Farbe und Geruch gestellten Anforderungen nicht erfüllen.

Die beste Handelsqualität ist also jene Sorte, die nach Vorklassifizierung in 3 Hauptmerkmale, nämlich

1) Glanz und Farbe,
2) Geruch,
3) Länge und Stärke der Narbenschenkel

jeweils die beste Note erhalten hat.

In den letzten Jahren ist die Anbaufläche in Spanien kleiner geworden, sie beträgt nur noch ca. 4 000 Hektar; diese verteilen sich auf die Gebiete:

Cuenca	2 200 ha
Tereul	700 ha
Albacete	500 ha
Valencia	300 ha
Toledo	200 ha
Zaragoza	100 ha

Bei Murcia, Ciudad Real, Alicante, Baleares und Guadaljara wird heute ebenfalls, jedoch nur auf kleinen Flächen, noch Safran angebaut. Die Anbauflächen sind deshalb kleiner geworden, weil die spanische Regierung den Anbau von Getreide durch Subventionen zu intensivieren sucht, da er den Einsatz von Maschinen in größerem Maße gestattet. Weiter beginnen auch in Spanien die Arbeitskräfte, die für den Anbau notwendig sind, knapper zu werden; die Anziehungskraft der in und um Madrid und an der Mittelmeerküste gelegenen, neu errichteten Industriezentren oder andere, bessere Verdienstmöglichkeiten tragen erheblich zur Dezimierung bei.

4) Der Export

Die nachstehende Tabelle orientiert über Ausfuhr und Länder, die den spanischen Safran in größeren Mengen einführen. Spanien produziert jährlich zwischen 40 000 bis 50 000 kg; davon werden etwa 75% unverarbeitet ausgeführt, der Rest verbleibt im eigenen Land.

Tabelle 6. Exporte von spanischem Safran [kg] in den Jahren 1961 und 1962

Importländer	1961	1962
Frankreich	6 625	6 693
Pakistan	3 781	1 884
Schweiz	3 350	2 771
BR Deutschland	3 301	2 739
Argentinien	2 134	2 863
Schweden	1 845	1 309
USA	1 070	1 119
Großbritannien	863	1 079
Saudi-Arabien	828	542
Sowjetunion	800	600
Marokko	829	402
Hongkong	518	551
Kuweit	436	562
Portug. Provinz Asiens	204	---
Holland	176	76
Ceylon	168	223
Italien	124	311
Japan	110	---
Südafrikanische Union	155	83
Mexiko	105	60
Venezuela	132	14
Scheichtum Baharein	84	372
Australien	23	23
Indien	8	11

5) Versuche, Protocrocin in frischen Narbenschenkeln nachzuweisen

Es wurde angenommen, daß Protocrocin nur in frischen Narbenschenkeln vorkommt und darin nachgewiesen werden kann; da es in getrockneten Drogen bisher nicht gefunden werden konnte.

Die Laboreinrichtung des VW-Expeditionsbusses erlaubte Untersuchungen an frischem Pflanzenmaterial direkt auf den Feldern im spanischen Anbaugebiet. Die Untersuchungsbedingungen (S. 45) konnten auf die verwendeten Platten und Kammern der DC-Grundausrüstung Minor übertragen werden. Zur Analyse wurden die Narbenschenkel direkt auf dem Feld aus der Blüte gezupft und sofort in Methanol zerquetscht sowie ca. 5 Minuten darin belassen.

Danach wurde die Untersuchungslösung neben den Lösungen der Vergleichssubstanzen aufgetragen und unter Lichtausschluß chromatographiert. Wenn Protocrocin in frischem Pflanzenmaterial enthalten wäre, müßte es auf Grund seiner gelben Farbe und Lage im Chromatogramm zu erkennen sein (Abb. 3a, S.25b).

Es wurde erwartet, daß Protocrocin nach der Chromatographie zwischen Crocin und Startpunkt liegen könnte, jedoch waren in diesem Bereich weder eine gelbe noch eine Fluorescens-löschende Zone zu erkennen. Die Vergleichsextrakte aus getrockneten Narbenschenkeln wiesen auf dem Chromatogramm keine Unterschiede auf. Material von 10 verschiedenen Standorten wurde auf diese Weise getestet.

Auf Grund dieser Versuche konnte einwandfrei festgestellt werden, daß Protocrocin selbst in frischen Narbenschenkeln nicht in der von KUHN postulierten Form vorliegt bzw. nachweisbar ist.

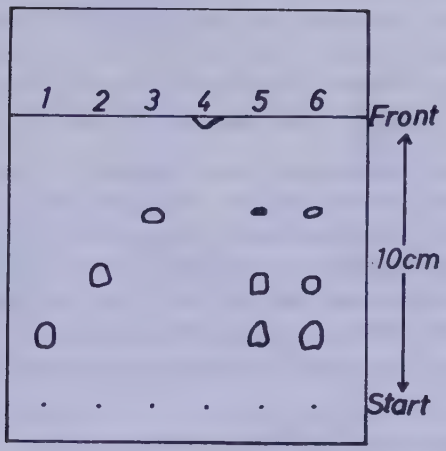


Abbildung 3a. Dünnschicht-Chromatogramm frischer Narbenschenkel und entspr. Trockenmaterial als Vergleich

1 Crocin
2 Picrocrocin
3 ß-Hydroxycyclocitral } als Vergleichslösung
4 Safranal

5 frische Narbenschenkel in Methanol
6 getrocknete Narbenschenkel in Methanol

II. Anbau verschiedener, handelsüblicher Fühjahrs- und Herbstcrocusse

Um für die eigenen vergleichenden Untersuchungen genügend Drogenmaterial zu erhalten, wurden 15 verschiedene Crocus-Sorten angebaut und über einige Jahre kultiviert. Die Zwiebeln stammten von der Fa. Van Tubergen, Haarlem (Holland). Das Stecken der Zwiebeln erfolgte Mitte Juli im Institutsgarten.

Die im Herbst blühenden Sorten ergaben in den Monaten Oktober und November des gleichen Jahres Ausbeuten von 0.2 - 0.6 g Narbenschenkel. Bei der Ernte wurde ebenso wie in Spanien verfahren. Die ganze Blüte pflückte man morgens in noch geschlossenem Zustand, bewahrte kühl auf und entfernte die Narbenschenkel sofort. Teils wurden sie direkt in Methanol gegeben, teils sofort bei -30° eingefroren und anschließend der Gefriertrocknung unterworfen.

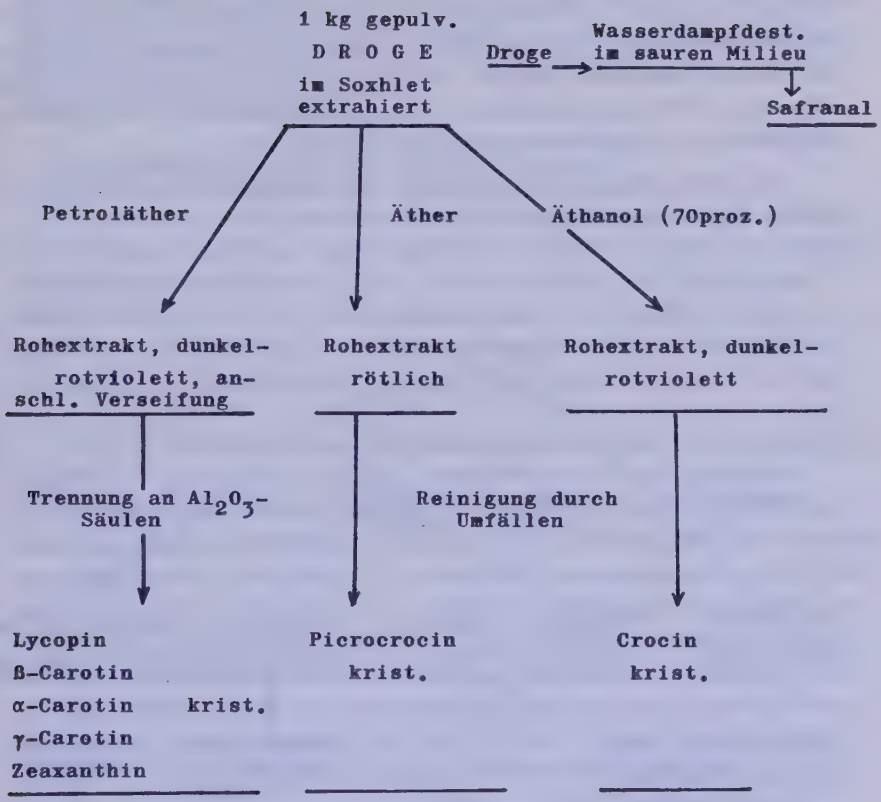
Folgende Crocus-Sorten wurden angebaut:

1) Crocus ancyrensis
2) Crocus aureus
3) Crocus biflorus
4) Crocus imperatii
5) Crocus sieberii
6) Crocus susianus
7) Crocus versicolor picturatus
8) Crocus speciosus
9) Crocus speciosus albus
10) Crocus zonatus
11) Crocus Jeanne d'Arc
12) Crocus Violet Vanguard
13) Crocus große Gelbe
14) Crocus kleine Gelbe
15) Crocus pulchellus

III. Zur Isolierung der Safran-Inhaltsstoffe

Zur Gewinnung der Safran-Inhaltsstoffe haben KUHN und Mitarbeiter [37] zunächst mit Petroläther, danach mit Äther und schließlich mit Äthanol extrahiert. Jedoch nur der Petrolätherextrakt wurde säulenchromatographisch zerlegt. Aus den anderen Extrakten wurden durch mehrfaches Umfällen und Umkristallisieren Picrocrocin und Crocin gewonnen.

Nachstehend auf S. 27 die schmatische Wiedergabe des Isolierungs- und Trennvorganges.



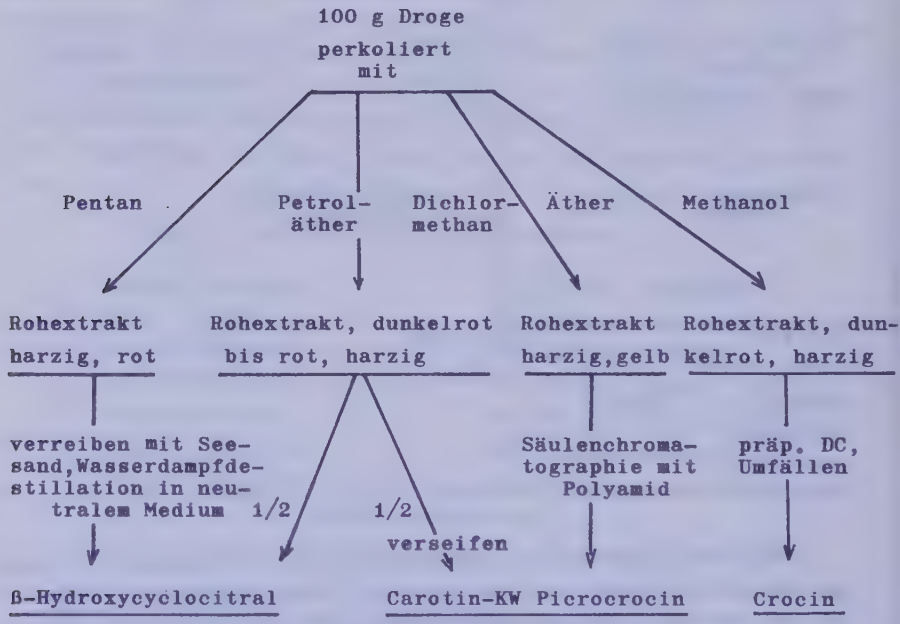
Über eine präparative chromatographische Trennung von Crocin und Picrocrocin sind in der Literatur keine Angaben zu finden. Bei der Nacharbeitung des von KUHN gegebenen Isolierungsschemas ergab sich der Wunsch zu einer Vereinfachung. Im folgenden wurde nun versucht, ein schonenderes und weniger zeitraubendes Isolierungsverfahren auszuarbeiten, da nur 100 g Droge eingesetzt wurden, während KUHN Kilomengen zur Verfügung standen.

1) Gewinnung durch Perkolation

Für die mikroanalytischen Untersuchungen der verschiedenen Crocus-Sorten wurden die nicht-handelsüblichen Substanzen, das ß-Hydroxycyclocitral und Picrocrocin, ferner reines Crocin und Crocetin als Vergleichssubstanz benötigt.

Im Gegensatz zur Extraktion im Soxhlet kann bei der Perkolation der Einfluß von Wärme und Licht auf Substanzen, die zu Umlagerungen neigen, ausgeschaltet sowie die Einwirkung von Luftsauerstoff vermieden werden; sie wurde daher angewendet. Die Rohextrakte wurden teils durch Säulenchromatographie, teils durch präparative DC und Umfällen weiter gereinigt.

Den nachstehend beschriebenen Isolierungsarbeiten lag folgendes Schema zugrunde:



a) Lipophile Substanzen

Um leicht-flüchtige Kohlenwasserstoffe aus der Droge zu erhalten, wurde mit Pentan perkoliert; höhersiedende Lösungsmittel sind in diesem Falle nicht geeignet, da beim Abdestillieren leichtflüchtige Naturstoffe mit übergehen. Anschließend wurde mit Petroläther und Dichlormethan extrahiert; in beiden Extrakten waren Carotin-Kohlenwasserstoffe enthalten. Die Lösungsmittel

wurden schonend entfernt. Neben dem dc-Nachweis der Carotin-Kohlenwasserstoffe [5] wurden die Rohextrakte der Wasserdampfdestillation in der "Karlsruher Apparatur" unterworfen, um flüchtige Substanzen abzutrennen.

α) Wasserdampfdestillation des Perkolats

Ein Teil der Lösungsmittel-freien Extrakte (10.6 g) wurde mit der gleichen Menge gereinigtem Seesand verrieben, mit Wasser versetzt und destilliert. Als Vorlage diente ein Gemisch aus Pentan-Äther (50 + 50). Nach 90min. Destillationszeit wurde eine gelbliche, safranartig riechende Lösung erhalten, die nach dem Abdampfen des Lösungsmittels einen Rückstand von nur 3 mg ergab.

Um die Zusammensetzung kennenzulernen, wurde das Öl chromatographiert. Auf Kieselgel-HF_{254}-Schichten mit Chloroform als Fließmittel konnte neben den in der Lösungsmittelfront befindlichen Terpenen eine Substanz gefunden werden, die mit 2.4-Dinitrophenylhydrazin eine positive Aldehyd/Keton-Reaktion zeigte. Zum Vergleich wurden Picrocrocin, Safranal und ein äthanolischer Safranextrakt mitchromatographiert. Die unbekannte Substanz liegt im Chromatogramm zwischen Picrocrocin und Safranal und ist auch in dem alkoholischen Safranextrakt enthalten. Sie reagiert zwar gleichartig wie Safranal, ist aber stärker polar. Der Verdacht lag nahe, daß es sich um ß-Hydroxycyclocitral handelt.

Bei späteren Versuchen konnte dies bestätigt werden, bei denen das Picrocrocin vor der DC mit ß-Glucosidase direkt auf dem Startpunkt gespalten werden konnte; man erhält dabei auf dem Chromatogramm nur ß-Hydroxycitral. Die Übereinstimmung der Farbreaktion, der hRf-Werte und des direkt auf der Platte aufgenommenen Remissionsspektrums (s.S. 38) erhärtete diesen Befund. Er widerspricht bisherigen Literaturangaben, nach denen nämlich der Hauptbestandteil des ätherischen Safranöls das Safranal sei allerdings unter der Voraussetzung, die Destillation unter normalen Bedingungen, d.h. nicht in Lauge oder Säure, vorzunehmen. Hierbei wurden 100 g ganze Narbenschenkel eingesetzt.

ß) Wasserdampfdestillation der Droge in neutralem Milieu

Neben der Möglichkeit, genuin in der Droge vorkommende, Wasserdampf-flüchtige Substanzen (ätherisches Öl), wie zuvor beschrieben, aus dem Extrakt zu gewinnen, kann die Droge direkt der Wasserdampfdestillation unterworfen werden. Von Nachteil ist dabei, daß im Anschluß an eine mehrstündige Destillationsdauer die recht teure Droge zu weiteren Untersuchungen nicht mehr verwendet werden kann. Zuerst im sauren oder alkalischen Milieu zu destillieren würde mit Sicherheit zu einer relativ hohen Ausbeute an ß-Dehydroxycyclocitral aus zersetztem Picrocrocin führen. Um dies zu vermeiden, wurde zuerst mit der Wasserdampfdestillation in neutralem Milieu begonnen, da die genuin in der Droge vorkommenden, Wasserdampf-flüchtigen Bestandteile erfaßt werden sollten. Dabei zeigte sich auch unter anderem, daß eine "Spaltung" unter den Bedingungen einer Wasserdampfdestillation bei Picrocrocin selbst nach dreistündiger Destillationsdauer nicht eintritt; dc konnte nämlich kein erhöhter Gehalt an ß-Hydroxycyclocitral und/oder ß-Dehydroxycyclocitral festgestellt werden.

Destillationsdiagramm von 100 g Droge

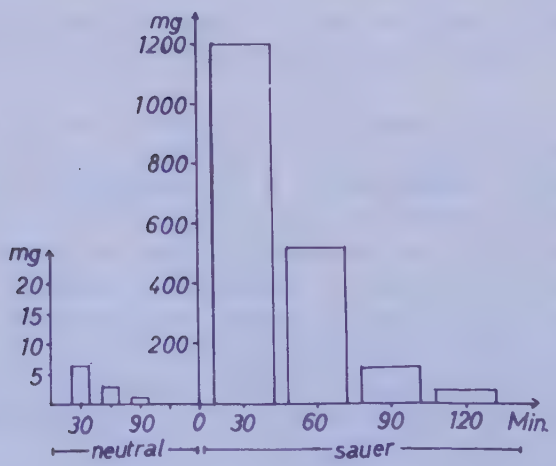


Abbildung 4. Destillationsdiagramm der Ausbeute an ätherischem Öl in neutralem und saurem Milieu aus 100 g Droge

Wie aus Abb. 4 ersichtlich ist, ging bei der Destillation in neutralem wie auch in saurem Milieu innerhalb 30 Minuten die Hauptmenge des ätherischen Öls über. Nach 120 Min. wurde die Destillation abgebrochen.

Neben den Extrakten, die unter den vorgenannten Bedingungen der Wasserdampfdestillation unterworfen wurden, wurde auch die Droge der gleichen Charge direkt zur Wasserdampfdestillation verwendet. Wie bei der Perkolation wurden 100 g Droge eingesetzt. Zuerst wurde in neutralem Milieu mit 2 ltr. Wasser in der "Karlsruher Apparatur" destilliert und das ätherische Öl in einem Pentan-Äther-Gemisch (50 + 50) aufgefangen. Nach 2stdg. Destillation wurde das Gemisch abgelassen, vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand gewogen; Rohausbeute 9.3 mg ätherisches Öl. Das Chromatogramm dieses Öls (Abbildung 5, unter 3, S.32) zeigte neben Terpenen eine Substanz (hRf = 12), die hRf-wertmäßig zwischen Picrocrocin (hRf = 3) und Safranal (hRf = 60) liegt und ebenso wie diese im kurzwelligen UV-Licht die Fluorescens der Kieselgel-HF_{254}-Schicht löscht. Die DC des Kolbeninhaltes ergab, daß das Picrocrocin darin noch unzersetzt enthalten war.

γ) <u>Wasserdampfdestillation der Droge in saurem Milieu</u> (Abb.4)

Der Kolbeninhalt der voranstehenden neutralen Wasserdampfdestillation wurde mit 100 ml 10proz. Schwefelsäure angesäuert und erneut 3 Stunden destilliert. Das übergehende ätherische Öl wurde in Pentan aufgefangen. Nachdem das Lösungsmittel entfernt war, betrug die Ausbeute 1.905 g eines gelblich-grünen Öls, das stark nach Safran roch.

Das Chromatogramm (4 in Abbildung 5, S.32) zeigt, daß dieses Öl zum überwiegenden Anteil aus Safranal besteht.

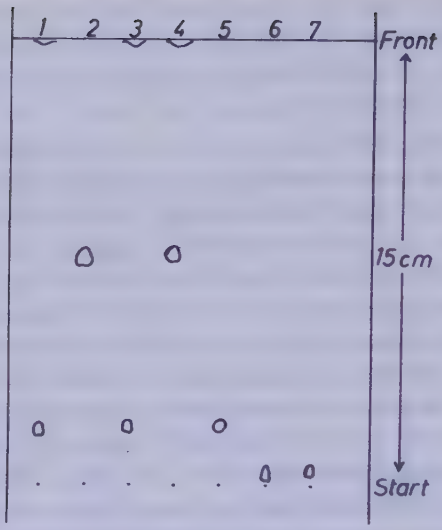


Abbildung 5. dc Vergleich der erhaltenen ätherischen Öle

1 Vereinigte Pentan-Petroläther-Dichlormethan-Extrakte der Perkolation (S.28) nach der Wasserdampfdestillation
2 Safranal (als Vergleichssubstanz)
3 äther. Öl der neutralen Wasserdampfdestillation (S.30)
4 äther.Öl der sauren Wasserdampfdestillation (S.31)
5 ß-Hydroxycyclocitral (als Vergleichssubstanz)
6 Picrocrocin aus Kolbeninhalt (S.31)
7 Picrocrocin (als Vergleichssubstanz)

Schicht: Kieselgel HF_{254}
Fließmittel: Benzol-Chloroform (10 + 90)
Sprühreagens: 2.4-Dinitro-phenylhydrazin-Lösung nach Markierung im kurzwelligen UV-Licht

Vorversuche zeigten, daß es zweckmäßig ist, vor der Extraktion des Picrocrocins mit Äther die lipophilen Substanzen weitgehend mit Petroläther + Dichlormethan zu entfernen.

b) Hydrophile Substanzen

α) Picrocrocin

Bei der Perkolation der vorextrahierten Droge mit wasserfreiem Äther wurde ein gelber, bitter schmeckender Rohextrakt erhalten, der nach dem schonenden Einengen im Rotationsverdampfer gegenüber den zuvor erhaltenen Extrakten nicht harzig war. Versuche, das Picrocrocin aus diesem Extrakt durch Fällung kristallin zu erhalten, gelangen nicht. Ebenso führte die präparative DC nicht zum Erfolg. Das Picrocrocin kann aus dem ausgeschabten Kieselgel nur mit Methanol oder Wasser eluiert werden; dabei gelangt immer etwas gelöstes Kieselgel in das Eluat und stört die Kristallisation. Deshalb wurden verschiedene Sorptionsmittel in der Säule auf ihr Trennverhalten gegenüber Picrocrocin getestet; gute Trennergebnisse wurden mit Polyamid erzielt. Mit Methanol-Wasser (90 + 10) als Elutionsmittel konnte so reines Picrocrocin erhalten werden, wie die DC-Kontrolle ergab. Das Picrocrocin-haltige Eluat wurde fast zur Trockne eingeengt und mit einigen ml eines Gemisches aus Äthanol-Chloroform (2 + 1) aufgenommen. Nach dem Stehenlassen bei -3° wurden gelbliche Kristalle erhalten.

Die physikalischen Daten der isolierten Substanz, wie Schmelzpunkt und UV-Spektrum in Transmission, stimmten mit den von KUHN (s.S. 15) angegebenen überein. Zur weiteren Kennzeichnung wurden das IR-Spektrum und das UV-Remissionsspektrum herangezogen.

Nachdem im Ätherextrakt dc kein Picrocrocin mehr nachzuweisen war, konnte mit der Isolierung des Crocins begonnen werden.

ß) Crocin

Die mit Äther vorextrahierte Droge wurde so lange mit Methanol perkoliert, bis sie nur noch schwach gelbstichig war. Versuche, das Crocin über Säulen zu reinigen, die mit den verschiedensten Sorptionsmitteln beschickt waren, führten zu keinem brauchbaren Ergebnis. Zwar ist bei ZECHMEISTER und CHOLNOKY [81] die Chromatographie eines alkoholischen Safranextraktes in einer

Aluminiumoxid-Säule beschrieben, die Autoren haben jedoch mit dieser Versuchsanordnung keine reinen Substanzen erhalten, sondern lediglich die gut sichtbare Verteilung der farbigen Safran-Inhaltsstoffe demonstriert. Zum Vergleich trennten sie einen alkoholischen Extrakt von Flores Calendulae gleichermaßen auf und zeigten damit die Unterschiede in Bezug auf die Inhaltsstoffe im Tages- und UV-Licht.

Da die analytische DC von alkoholischen Safranextrakten auf Kieselgel-G-Schichten mit einem wasserhaltigen Fließmittel saubere Trennergebnisse zeigte, verwendete man 0.3 mm dicke Schichten und trug den Extrakt bandförmig auf. Die Trennergebnisse waren gut, jedoch zeigten sich beim nachfolgenden Eluieren mit Methanol oder Wasser auch hier die schon beim Picrocrocin beschriebenen Schwierigkeiten der Kristallisation.

Auf 1 mm dicken Cellulose-Schichten konnte mit einem pyridinhaltigen Fließmittel eine gute Trennung der aufgetragenen Farbstoffbänder erhalten werden, das Entfernen des Pyridins im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure war aber langwierig. Nach dem Eluieren mit Methanol konnten ca. 2 - 3 mg reines Crocin erhalten werden. Der Hauptanteil des Methanolextraktes wurde nach der Vorschrift von KUHN [37] durch mehrmaliges Umfällen gereinigt; dabei konnten nach zweimonatigem Stehenlassen im Kühlschrank ca. 2.5 g Crocin erhalten werden. Die dunkel-rotbraunen Kristalle schmolzen bei 186°. Zum weiteren Identitätsbeweis wurde ein Remissionsspektrum aufgenommen.- Ferner wurde die Substanz durch Säure, Lauge und verschiedene spezifische Enzyme (s.S. 59) mit gutem Erfolg gespalten; die entstandenen Spaltprodukte wurden als Crocetin und Zucker identifiziert. Der Zuckeranteil wurde auch quantitativ bestimmt (s.S. 74).

Zur sicheren Identifizierung der Substanzen des Wasserdampfdestillates (Safranal, ß-Hydroxycyclocitral) und des Picrocrocins wurden die UV-Remissionsspektren direkt auf dem Chromatogramm sowie die IR-Spektren (als Film bzw. in KBr) aufgenommen.

IV. Diskussion der Spektren

1) IR-Spektren von Picrocrocin, ß-Hydroxycitral und Safranal

Die IR-Spektren unterscheiden sich zwar hinsichtlich Intensität und Ausbildung einzelner Maxima z.T. sehr stark, zeigen aber in deren Lage die hinsichtlich des gemeinsamen substituierten Cyclohexen- bzw. Cyclohexadien-Ringes erwartete Uniformität.

So haben alle 3 Verbindungen CH-Valenzschwingungen im Bereich von 3000 - 2700 cm^{-1}, die auf Methylengruppen (2930 $\pm$ 20 cm^{-1}), auf CH_2-Reste (um 2900 cm^{-1}) und auf die charakteristische, aufgespaltene CH-Absorption von Aldehyden hinweisen. Deren CO-Absorption ist einwandfrei zu lokalisieren: Bei 1658 cm^{-1} (Safranal) entspricht sie einem 2.4-Dienal und bei 1675 cm^{-1} (ß-Hydroxycyclocitral) einem α.ß-ungesättigten Aldehyd; beim Picrocrocin fällt sie mit 1653 cm^{-1} zwar aus dem normalen Bereich heraus, deutet aber in Verbindung mit einer OH-Bande bei 3290 cm^{-1} auf die O...H-Brückenbindung zwischen CH—O- und HO-Gruppen des Glucosids hin, die sich intermolekular ausbilden kann und deshalb nur im festen Zustand aufgefunden wird. Die Mehrheit der Zucker-Hydroxyle ist dagegen noch frei, wie aus der zusätzlichen Absorption bei 3356 cm^{-1}, den Maxima für sekundäre Alkohole bei 1280 und 1250 cm^{-1} sowie den normalen Hexopyranose-Maxima bei 1082, 1044, 1043 und 1022 cm^{-1} hervorgeht. Daß es sich beim Picrocrocin um ein ß-Glucopyranosid handelt, zeigt die charakteristische Bande bei 906 cm^{-1}, die ebenso wie die vorerwähnten Zucker-Absorptionen bei Safranal und ß-Hydroxycyclocitral fehlen. Intermolekulare O···H-Brücken zwischen Einzelmolekülen müssen nach der OH-Bande bei 3425 cm^{-1} im ß-Hydroxycyclocitral vorliegen, das sich in den C—H-Schwingungen nur wenig von den Vergleichssubstanzen unterscheidet. Man findet hier lediglich Andeutungen von Safranal-Schwingungen, die bei jener Substanz (Safranal) sehr stark und charakteristisch erscheinen: Die Absorptionen eines α.ß-disubstituierten cis-Olefins bei 3003, 1631 und 1403 cm^{-1} können ausschließlich von der 3.4-Doppelbindung des Safranals hervorgerufen werden und sind nur in dessen IR-Spektrum feststellbar. Die asymmetrischen CH_3-C-Schwingungen absorbieren bei 1460 und 1380 cm^{-1}, diejenigen von $(CH_3)_2C$-Gruppen bei 1380 und 1360 cm^{-1}.

Nimmt man dazu die CH-Gerüstschwingungen der Isopropylgruppe bei ca. 1180 ± 10, 1150 ± 10 und 760 ± 10 cm^{-1} im Verein mit derjenigen der $-(CH_2)_n$-Gruppierung bei 720 cm^{-1}, so läßt sich das 1.1.3-Trimethyl-cyclohexen-(2)-Skelett als gemeinsames Merkmal der drei untersuchten Substanzen feststellen; vgl. hierzu Abbildung 6a, b und c.

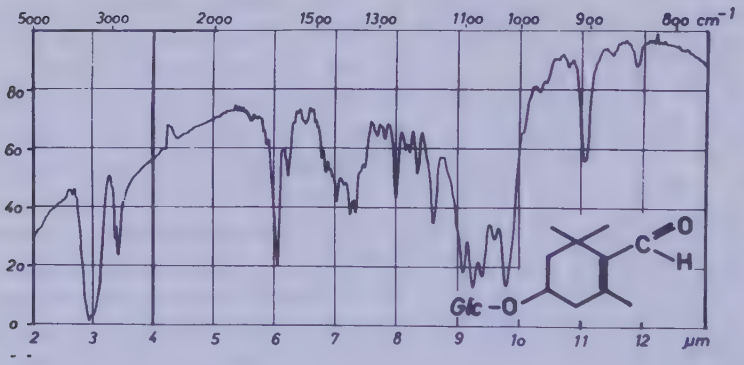


Abb. 6a (Text auf S. 37)

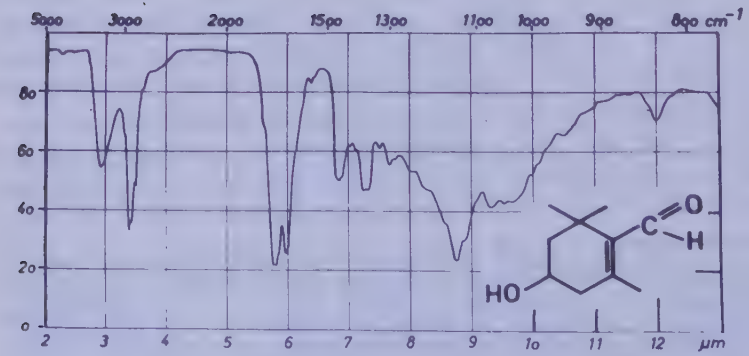


Abb. 6b (Text auf S. 37)

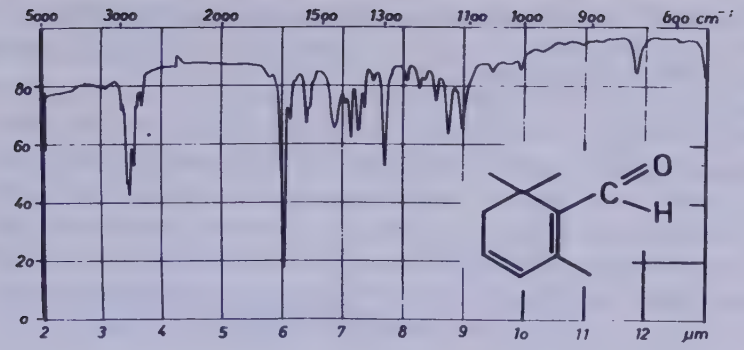


Abb. 6c

Abbildung 6. IR-Spektren von a) Picrocrocin (in KBr), b) ß-Hydroxycyclocitral [4-Hydroxy-2.6.6-trimethyl-cyclohexen-(1)-aldehyd-(1), als Film] und c) Safranal [2.6.6-Trimethyl-cyclohexadien-(1.3)-aldehyd-(1), als Film]

2) Remissionsspektren von Crocin, Picrocrocin, ß-Hydroxycyclocitral und Safranal

Um bei der quantitativen Auswertung bei optimaler Meßwellenlänge arbeiten zu können, wurden von den in Frage kommenden Verbindungen die Absorptionskurven auf Kieselgel-HF_{254}- bzw. Cellulose-Schichten direkt aufgenommen (Remissionsspektren, R). Zum Vergleich wurden die Transmissionsspektren (T) der gelösten Substanzen herangezogen. So ergaben sich im R-Spektrum Maxima für Crocin bei 453 und 480 nm; im T-Spektrum lagen sie dagegen bei 432 und 463 nm; für Picrocrocin im R-Spektrum bei 252 nm, im T-Spektrum bei 230 nm; für ß-Hydroxycyclocitral im R-Spektrum bei 255 nm, im T-Spektrum bei 245.5 nm; für Safranal im R-Spektrum bei 240 und 280 nm, im T-Spektrum bei 247 nm (Abb. 7, S. 38).

Die R-Spektren dieser Verbindungen (ausgenommen Safranal) zeigen eine Rotverschiebung der Maxima. Am deutlichsten ist die auf Mediumeffekte zurückzuführende Verlagerung der Bande beim Crocin (+ 20 nm) zu erkennen. Beim Safranal treten im R-Spektrum

(nicht dagegen im T-Spektrum) 2 Banden bei 240.5 und 280 nm auf, von denen die längerwellige vermutlich der Carbonyl-Bande zuzuordnen ist. Das Auftreten dieser Bande läßt sich durch Adsorptionseffekte erklären.

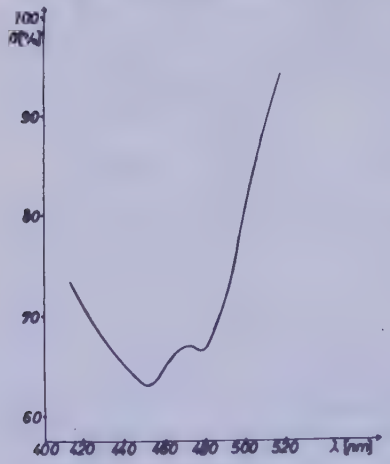


Abbildung 7a

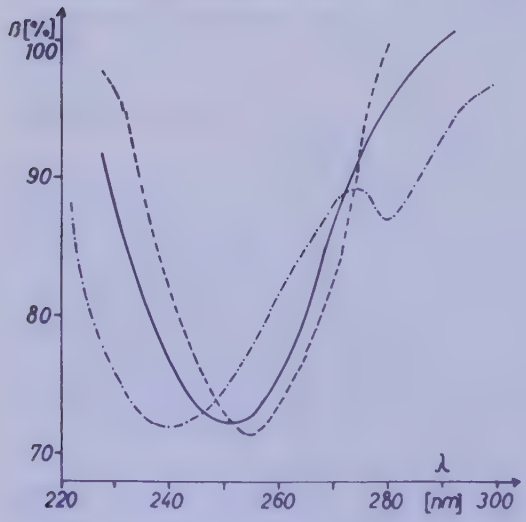


Abbildung 7b

Abbildung 7

Remissionsspektren von 7a: Crocin (——) auf Cellulose MN 300, 7b: Picrocrocin (——), ß-Hydroxycyclocitral (---) und Safranal (•-•-•) auf Kieselgel HF_{254} gemessen.

V. Versuche zur thermischen Spaltung des Picrocrocins

Zur einfachen und schnellen thermischen Abtrennung mit direkter anschließender Auftragung wurde von STAHL [57] das TAS-Verfahren (Thermomikro-Abtrenn-Transfer- und Aufgabeverfahren für Substanzen nach STAHL) entwickelt. Einige Anwendungsmöglichkeiten wurden kürzlich an einer Reihe Drogen, die ätherisches Öl [61] enthalten, demonstriert. Mit Hilfe dieses Verfahrens ist es möglich, aus kleinsten Mengen die flüchtigen Bestandteile direkt auf den Startpunkt einer DC-Platte aufzudampfen. Anschließend wird in bekannter Weise chromatographiert.

Bei den eigenen Versuchen war das Verhalten des Picrocrocins gegenüber Temperatureinwirkung zu untersuchen. Dazu war der TAS-Ofen besonders geeignet, weil die Substanz in der Glaspatrone belassen werden konnte und mit jeder höheren Temperatureinstellung ein neuer Startpunkt auf der DC-Platte als Vorlage diente. Zuerst wurde unter Bedingungen erhitzt, wie sie beim Trocknen der Droge nach der Ernte herrschen, nämlich 30 Minuten bei ca. 50°. Anschließend wurde 30 Minuten bei 70° und 90° erhitzt. Erst bei der letzteren Temperatur zeigte sich am Startpunkt einer Kieselgel-HF_{254}-Platte ein Fluorescens-löschender Fleck. Die DC zeigte, daß es sich um Safranal handelt. Bei dieser Temperatur beginnt also schon eine thermische Spaltung des Picrocrocins. Jetzt wurde die Temperatur kräftig erhöht, die Verweilzeit aber verringert. Diese Versuche zeigten, daß bei 200° nur 60 Sekunden benötigt werden, um das Picrocrocin aus 20 mg einer Picrocrocin-Stärkeverreibung 1:100 zu spalten und quantitativ auf eine DC-Platte zu bringen.

Es war ferner von Interesse, festzustellen, ob während der Spaltung oder im Verlauf des Aufdampfvorgangs neben Safranal auch ß-Hydroxycyclocitral aus dem Picrocrocin entsteht.

Entsprechende Versuche mit ß-Hydroxycyclocitral zeigten, daß unter den angewandten Bedingungen eine zu Safranal führende Wasserabspaltung nicht eintritt. Ferner ergaben Versuche mit Picrocrocin, daß bei den genannten Spaltungsbedingungen diese Verbindung nicht entsteht.

Es war von Interesse, ob man das TAS-Verfahren auch zur Kennzeichnung des Safrans heranziehen kann. Hierzu wurden einige Milligramm Safran und 50 mg inaktiviertes Blaugel (als Treibmittel) in die Patrone gegeben. Es zeigte sich nach der DC und dem Besprühen mit 2.4-Dinitro-phenylhydrazin-Lösung auf der Platte:

1) Picrocrocin ist nicht flüchtig und kann somit nicht aufgedampft werden; jedoch beginnt die thermische Spaltung bei ca. 100°, wie im 30-Minuten-Versuch gezeigt werden konnte.

2) ß-Hydroxycyclocitral kann selbst bei Temperaturen um 250° aufgedampft und dc als solches nachgewiesen werden; daran ändert auch ein nachträgliches 5 Minuten langes Erhitzen der aufgedampften Substanz am Startpunkt nichts. Es kommt nicht zu einer wasserabspaltenden Safranalbildung.

3) Aus Safran-Narbenschenkeln lassen sich bei 200° nach 30 Sekunden Verweilzeit ß-Hydroxycyclocitral und Safranal nachweisen; bei gleicher Temperatur, aber bei 60 Sekunden Verweilzeit, kann Picrocrocin quantitativ in der Droge zu Safranal gespalten und als solches nachgewiesen werden. Das nachzuweisende ß-Hydroxycyclocitral entsteht also nicht während des TAS-Verfahrens, sondern ist in der Droge vorhanden.

Versuche, die Carotin-Kohlenwasserstoffe in gleicher Weise aufzudampfen und diese mit zur Identifizierung der Droge zu verwenden, gelangen erwartungsgemäß nicht. Eine Überführung von Carotinoiden in die leicht flüchtigere Form ihrer Trimethylsilyl-Verbindungen erbrachte noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Das DC dieser Verbindungen aus dem TAS-Verfahren sowie die entsprechenden Vergleichssubstanzen sind in Abbildung 8 wiedergegeben (S.41).

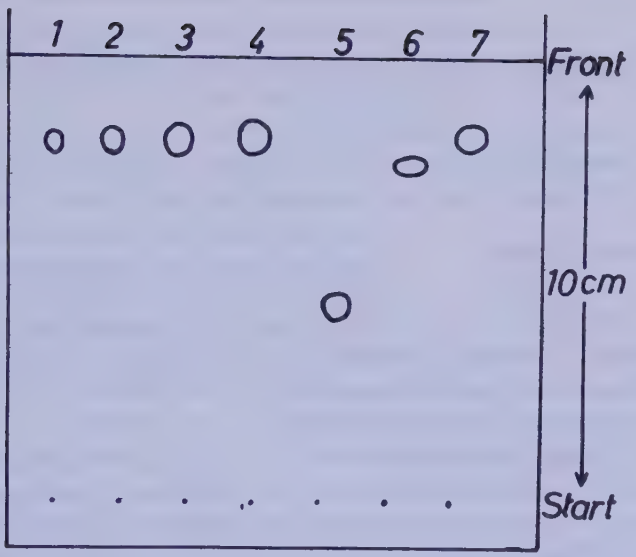


Abbildung 8. Dünnschicht-Chromatogramm der aus Picrocrocin und Narbenschenkeln resultierenden Substanzen beim TAS-Verfahren

a) Aufgedampft wurden:

1 Picrocrocin-Stärkeverreibung (1 + 99, 20 mg); Verweilzeit 30 Sekunden

2 ds., jedoch bei 60 Sekunden Verweilzeit

3 8 mg Narbenschenkel von C. sativus L.; Verweilzeit 30 Sekunden (Treibmittel: 20 mg inaktiviertes Blaugel)

4 ds., jedoch bei 60 Sekunden Verweilzeit

b) Aufgetragen wurden:

5 Picrocrocin als Lösung zum Vergleich (20 µg, hRf = 45)

6 ß-Hydroxycyclocitral als Lösung z.Vergleich(20 µg, hRf = 75)

7 Safranal als Lösung zum Vergleich (20 µg, hRf = 83)

Schicht: Kieselgel HF_{254}
Fließmittel: $CHCl_3$-Methanol (80 + 20)
Sprühreagens: 2.4-Dinitro-phenylhydrazin-Lösung nach Merkierung im kurzwelligen UV-Licht

1) Auftragversuche des trans-Crocetindimethylesters mit dem TAS-Ofen

$H_3COOC-R-COOCH_3$
R = Crocetin

Neben den Versuchen, Picrocrocin, ß-Hydroxycyclocitral und die Trimethylsilyl-Verbindungen von Carotinoiden sowie die Inhaltsstoffe der Narbenschenkel direkt auf die Platte aufzudampfen, wurde auch der trans-Dimethylester des Crocetins in die Untersuchungen einbezogen. Bereits KUHN und WINTERSTEIN [38] zeigten, daß diese Substanz unzersetzt destillierbar ist.

Zu Vorversuchen wurde reines Crocetin in Chloroform suspendiert und mit Diazomethan-Äther [25] versetzt, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Die erhaltenen Kristalle (Crocetindimethylester) schmolzen bei 220 - 222°. Ebenso wurde ein Narbenschenkel gepulvert, in Chloroform suspendiert und mit Diazomethan-Äther versetzt. Nach 5 Minuten Reaktionsdauer wurde auch hier das Lösungsmittel entfernt.

Von dem Crocetindimethylester wurde eine Stärkeverreibung 1:100 hergestellt; davon wurden 20 mg in die TAS-Patrone gegeben und bei 200° im TAS-Ofen auf eine Kieselgel-Schicht aufgedampft. Am Startpunkt war bereits nach 15 Sekunden ein gelber Fleck zu erkennen.

20 mg mit Diazomethan behandeltes Drogenpulver wurden mit 50 mg inaktiviertem Blaugel ebenfalls in eine TAS-Patrone gegeben und wie zuvor am Startpunkt aufgedampft. Auch hier war ein gelber Fleck deutlich zu erkennen.

Zum Vergleich wurde eine Probe von Crocetindimethylester auf die Platte aufgetragen und anschließend mit Dichlormethan-Äthylacetat (80 + 20) chromatographiert. Das Chromatogramm zeigte übereinstimmende hRf-Werte von aufgedampften und aufgetragenen Proben. Mit Antimontrichlorid-Lösung besprüht, gaben die entsprechenden Flecke nach dem Erhitzen die charakteristische blaue Farbe. So konnte gezeigt werden, daß trans-Crocetindimethylester, ein C_{22}-Körper, als Reinsubstanz wie auch als Reaktionsprodukt direkt aus einer Droge mit dem TAS-Verfahren aufgedampft und dc nachgewiesen werden kann.

VI. Chromatographische Methoden

Für die geplanten Untersuchungen der Inhaltsstoffe einheimischer Crocus-Sorten stand wenig Material zur Verfügung. Daher wurden vorzugsweise chromatographische Trenn- und Nachweismethoden angewandt. Die Versuchsbedingungen mußten jedoch zuvor ermittelt werden.

1) Dünnschicht-Chromatographie

Zur Isolierung von ß-Carotin aus Karotten verwendete MOTTIER [45] Anfang der fünfziger Jahre mit Erfolg lose Aluminiumoxid-Schichten und Benzol als Fließmittel. STAHL [58] zeigte 1958, daß man auch Carotine noch besser auf festhaftenden Kieselgel-Schichten trennen kann; zusammen mit BOLLIGER und LEHNERT [60] bearbeitete er dann systematisch die Trennmöglichkeiten der wichtigsten Carotin-Kohlenwasserstoffe und Carotinoide. Inzwischen sind nahezu 100 Veröffentlichungen auf diesem Gebiet erschienen (vgl. z.B. [5]). Über die dc-Trennung der hydrophilen Safran-Inhaltsstoffe liegen m.W. keine Veröffentlichungen vor.

Für die eigenen Trennversuche mußte ein annähernd neutrales Fließmittel gefunden werden, damit das Crocin nicht schon während des Chromatographierens gespalten wird. Die Versuche ergaben, daß man auf Kieselgel HF_{254} mit dem Fließmittel Äthylacetat-Isopropanol-Wasser (65 + 23.5 + 11.5) die besten Ergebnisse erhält. Die farbigen Substanzen wurden damit gut von den Fluorescens-löschenden Substanzen Picrocrocin und ß-Hydroxycyclocitral getrennt, und

eine Erkennung der genannten war schon im kurzwelligen UV-Licht möglich. Für präparative Trennungen erwiesen sich Cellulose-Platten als besonders geeignet. Mit einem Pyridin-haltigen Fließmittel gelang eine vorzügliche Trennung der hydrophilen Carotinoide aus heimischen Crocus-Sorten. Durch dieses dc-Verfahren konnten neben dem Crocin 2 weitere gelbe Substanzen mit einem niedrigeren hRf-Wert gefunden werden (vgl. S.52).

a) Nachweismethoden

Zum einfachen Nachweis des Picrocrocins und der daraus entstehenden Substanzen eignet sich neben der bereits beschriebenen Fluorescenslöschung auch das Aufsprühen von 2.4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (untere Nachweisbarkeitsgrenze 0.8 µg). Ein Erhitzen ist hierbei nicht notwendig, um die Farbreaktion zu erzeugen. Dies ist bei Untersuchungen außerhalb des Labors, z.B. bei Expeditionen, wichtig, wo oft geeignete Möglichkeiten fehlen, um Platten zu erhitzen. Weiter wurde noch das ammoniakalische Silbernitrat-Reagens erprobt. Nach 10 Min. erkennt man Picrocrocin und ß-Hydroxycyclocitral in Form brauner Flecke.

Die Carotinoide wurden mit Antimontrichlorid- oder Bortrifluorid-Reagens nachgewiesen. Beide Reagentien sind für Crocin nicht befriedigend, da die charakteristische blaue Farbe erst entsteht, wenn relativ große Reagensmengen aufgesprüht werden. Eine nachfolgende Photographie oder das Abzeichnen der Platte ist dann nahezu unmöglich, da die Schicht zu transparent geworden ist.

Als Sprühreagens der auf Cellulose-Schichten getrennten gelben Farbstoffe wurde ammoniakalische Silbernitrat-Lösung verwendet. Dabei konnte freie Glucose sofort erkannt werden, während die Glykoside erst nach 10 min. Erhitzen auf 110 - 115° reduzierend wirken.

Nach den Ergebnissen, die bei dc-Trennversuchen erhalten wurden, konnte die nachstehende Arbeitsanweisung zur Prüfung von Safran für Arzneibuchzwecke zusammengestellt werden.

2) Arbeitsanweisung zur Prüfung von Safran auf Identität

1) Lösungen zum Auftragen

a) Untersuchungslösung: 10 mg Droge werden in einem kleinen Reagensglas (ca. 6.0 x 0.7 cm) mit einem Glasstab vorsichtig zerdrückt und mit einem Tropfen dest.Wasser angefeuchtet. Nach 2 - 3 Minuten wird 1 ml Methanol zugegeben und die Lösung 20 Min. im Dunkeln belassen.

b) Vergleichslösung: In 1 ml Methanol werden je 1 mg Picrocrocin, ß-Hydroxycyclocitral und Safranal sowie 0.5 mg Crocin gelöst. Hiervon trägt man neben der zu untersuchenden Lösung jeweils 5 µl auf.

2) Dünnschicht-Chromatographie

Es gelten die Standard-Bedingungen.

a) Versuchsanordnung: Als Schicht dient Kieselgel HF_{254}. Man entwickelt mit Äthylacetat-Isopropanol-Wasser (65 + 23.5 + 11.5) einmal 10 cm hoch bei Kammersättigung. Zunächst wird das Chromatogramm im kurzwelligen UV-Licht (254 nm) betrachtet und anschließend mit 2.4-Dinitro-phenylhydrazin-Lösung besprüht.

b) Auswertung: Im Chromatogramm der zu untersuchenden Lösung erkennt man im kurzwelligen UV-Licht 2 Fluorescens-löschende Zonen, das Picrocrocin im hRf-Bereich 45 und ß-Hydroxycyclocitral im Bereich 65. Das Crocin liegt als gelbe Zone im hRf-Bereich 30 vor. Nach dem Besprühen mit 2.4-Dinitro-phenylhydrazin-Lösung ergeben Picrocrocin und ß-Hydroxycyclocitral nach 5 Minuten organgefarbene Zonen.

Nachdem eine analytische Trennung der interessierenden Substanzen möglich war, wurde mit Hilfe der präparativen DC versucht, das Picrocrocin und Crocin kristallin zu gewinnen.

3) Präparative DC

a) Picrocrocin

α) Trennung: Aus einem methanolischen Gesamtextrakt war eine Trennung mit 0.3 mm dicken Kieselgel-HF_{254}-Schichten möglich. Dickere Schichten (0.8 - 1.2 mm) ergaben in diesem Falle

mit dem zur analytischen Trennung verwendeten Fließmittel unbefriedigende Ergebnisse.

ß) Markierung und Ausschaben der getrennten Substanz nach der Chromatographie: Wie schon auf S. 32 (Abb. 5) beschrieben, kann Picrocrocin auf den verwendeten HF_{254}-Schichten an der Löschung der Fluorescens erkannt werden. Das Ausschaben der markierten Picrocrocin-Zone erfolgt bei noch feuchter Schicht direkt in ein Gefäß mit Aceton.

γ) Elution des Picrocrocins: Kieselgel und Aceton werden in eine Säule (2.5 x 20 cm) eingeschlämmt und nach dem Absetzen des Sorptionsmittels wird weiter mit Aceton eluiert. Auf diese Weise konnte jedoch nur wenig Picrocrocin gewonnen werden; die größere Menge blieb im Kieselgel zurück. Wird weiter mit Methanol eluiert, ergeben sich die schon auf S. 33 (unter b) beschriebenen Schwierigkeiten. Die präparative DC eignet sich demnach zur Isolierung von Picrocrocin nicht gut, da das mitgelöste Kieselgel zu erheblichen Substanzverlusten beim Umkristallisieren führt.

b) Crocin

α) Trennung: Auf 1 mm dicken Cellulose-Schichten wurde mit dem Fließmittel Pyridin-Äthylacetat-Wasser (20 + 40 + 40, Oberphase) eine gute Trennung des methanolischen Gesamtextraktes erhalten.

ß) Elution des Crocins: Die farbige Crocin-Zone ist gut sichtbar und kann nach dem Entfernen des Fließmittels (s.S.34) ausgeschabt werden; nach Aufschlämmen in Methanol wird das Gemisch in eine Säule (2.5 x 20 cm) gegeben und mit weiterem Methanol eluiert.

γ) Kristallisation des Crocins: Nach Entfernen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer wurde eine zähe, dunkelrote, nicht-kristallisierende Masse erhalten. Sie wurde erneut mit Äthanol-Äther (2 + 1) in Lösung gebracht und 2 Monate bei -3^{o} belassen; danach konnte eine geringe Menge (2 mg) an Kristallen erhalten werden. Die Hauptmenge des Crocins blieb jedoch in der Mutterlauge zurück.

4) Säulenchromatographie

a) Picrocrocin

Wie schon erwähnt, wurden Versuche unternommen, Picrocrocin und Crocin in größerem Maßstab säulenchromatographisch zu gewinnen. Erfolgreich waren jedoch nur Versuche mit Picrocrocin an Polyamid-Säulen. Aus dem Rückstand der Äther-Perkolation konnte Picrocrocin mit Methanol-Wasser-Gemischen von den Begleitsubstanzen getrennt und nach dem Einengen kristallin erhalten werden. Aus 0.2 g Rohextrakt wurden so 30 mg reines Picrocrocin erhalten.

b) Reinigung von präparativ gewonnenem Crocetin

Durch ammoniakalische Spaltung von Crocin wurde unreines Crocetin erhalten. Es wurde an einer Kieselgel-Säule mit Benzol-Dichlormethan (1 + 2) von Zwischenprodukten befreit und konnte anschließend mit Dichlormethan eluiert werden. Lösungsmittelreste wurden im Rotationsverdampfer schonend bei 30 - 35° entfernt. Aus 1.0 g Rohcrocetin konnten so 0.8 g reine Substanz gewonnen werden.

VII. dc-Untersuchungen an heimischen Crocus-Sorten

Mit Hilfe dieser Analysenmethoden konnten nun die angebauten Crocus-Sorten auf das Vorkommen von Crocin, Crocetin und Picrocrocin untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurden zunächst von den Blütenbestandteilen einzelner Sorten Größe, Gewicht, Trockengewicht sowie die Farbe ermittelt (Tabelle 7, S.48). In Tabelle 8 (S. 50) sind die Ergebnisse der chromatographischen Untersuchung wiedergegeben.

Aus den Tabellen 7 und 8 ist ersichtlich, daß die Safran-Narben verschieden groß sind und auch der Gehalt an Crocin sehr unterschiedlich ist; allerdings liegt dieses in allen untersuchten Narben vor. Den höchsten Crocin-Gehalt haben Crocus sativus L. und Crocus speciosus.

Tabelle 7. Größe, Gewicht, Trockengewicht und Farbe der Blütenbestandteile heimischer Crocus-Sorten

	C.imperati	C.speciosus	C."Jeanne d'Arc"	C."Violet Vanguard"	C.versicolor picturatus	C.biflorus	C.sieberi	C.susianus
Blütenblätter								
Größe (cm)	4.1	4.5	4.6	5.0	4.5	3.8	3.0	2.7
Frischgew.(g)	3.8	3.2	3.8	4.1	4.0	3.6	3.4	2.9
Trockengew.(g)	0.7	0.75	0.7	0.7	0.64	0.61	0.63	0.59
Farbe	violett	violett	weiß	violett	weiß-violett	violett	hell-violett	violett
Narbenschenkel								
Größe (cm)	3.1	2.8	3.0	3.5	2.9	2.0	2.5	2.2
Frischgew.(mg)	20.1	10.0	15.1	19.0	19.5	4.2	6.1	9.8
Trockengew.(mg)	4.98	3.2	4.1	5.0	5.5	1.0	2.0	1.9
Farbe	gelb	orange	gelb	orange	orange	gelb	orange	gelb
Staubgefäße								
Größe (cm)	2.3	2.7	2.8	2.6	2.8	1.7	1.73	1.3
Frischgew.(mg)	16.7	16.0	15.0	13.1	12.3	11.2	10.7	9.0
Trockengew.(mg)	5.0	3.6	5.0	3.9	3.4	2.7	2.1	1.8
Farbe	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb

Tabelle 7 (Fortsetzung)

	C.sativus	C.zonatus	C. ancyrensis	C."Große Gelbe"	C."Kleine Gelbe"	C.aureus	C.pulchellus
Blütenblätter							
Größe (cm)	4.8	2.9	3.2	3.9	2.8	3.2	3.8
Frischgew.(g)	4.9	3.0	3.1	3.7	2.5	3.3	2.7
Trockengew.(g)	0.75	0.6	0.58	0.62	0.53	0.6	0.5
Farbe	dunkel-violett	hell-violett	gelb	gelb	gelb	gelb	hell-violett
Narbenschenkel							
Größe (cm)	4.1	2.7	1.9	2.2	2.0	1.8	2.1
Frischgew.(mg)	29.4	11.0	7.2	8.0	6.2	6.0	12.0
Trockengew.(mg)	22.5	3.9	?	2.5	1.8	1.0	2.3
Farbe	dunkel-rot	orange	gelb-lich	gelb-lich	gelb	gelb	orange
Staubgefäße							
Größe (cm)	-	1.75	1.6	1.8	1.3	1.6	1.3
Frischgew.(mg)	-	10.0	9.3	verkümmert		7.2	6.0
Trockengew.(mg)	-	2.0	1.8	-	-	1.9	-
Farbe	-	gelb	gelblich	-	-	gelb	-

Tabelle 8. Vorkommen von Picrocrocin, Crocin und Crocetin in Blütenorganen

Crocus-Sorte	Inhaltsstoff	Narbenschenkel	Staubgefäße	Blütenblätter
C. aureus	Picrocrocin	--	--	--
	Crocin	++	(+)	+
	Crocetin	--	+	+
C. biflorus	Picrocrocin	--	--	--
	Crocin	+	(+)	--
	Crocetin	--	--	--
C.ancyrensis	Picrocrocin	--	--	--
	Crocin	+	--	--
	Crocetin	--	(+)	--
C.zonatus	Picrocrocin	--	--	--
	Crocin	++	+	--
	Crocetin	+	(+)	--
C.pulchellus	Picrocrocin	--	--	--
	Crocin	+	+	--
	Crocetin	--	--	--
C.speciosus	Picrocrocin	--	--	--
	Crocin	+++	+	--
	Crocetin	--	(+)	--
C.sieberi	Picrocrocin	--	--	--
	Crocin	++	+	+
	Crocetin	+	(+)	--
C.imperati	Picrocrocin	--	--	--
	Crocin	++	+	--
	Crocetin	+	(+)	--
C.versicolor picturatus	Picrocrocin	--	--	--
	Crocin	++	+	--
	Crocetin	+	(+)	--
C.sativus	Picrocrocin	++++	--	--
	Crocin	++++	--	--
	Crocetin	--	--	--
C. "Große Gelbe"	Picrocrocin	--	--	--
	Crocin	++	(+)	(+)
	Crocetin	--	(+)	(+)
C. "Kleine Gelbe"	Picrocrocin	--	--	--
	Crocin	+	(+)	(+)
	Crocetin	--	(+)	(+)
C. "Jeanne d'Arc"	Picrocrocin	--	--	--
	Crocin	++	--	--
	Crocetin	+	--	--
C. "Violet Vanguard"	Picrocrocin	--	--	--
	Crocin	++	--	--
	Crocetin	+	(+)	--

In den Staubgefäßen der verschiedenen Sorten ist der Gehalt an Crocin und Crocetin sehr viel geringer, oder diese Verbindungen fehlen ganz. In den Staubgefäßen des Safrancrocus z.B. konnten beide Substanzen nicht nachgewiesen werden. Die Blütenblätter sind meist Carotin-frei, nur einige enthalten Crocin und Crocetin.

Im Hinblick auf die KUHNsche Protocrocin-Theorie [37] ist nun das Vorkommen des Picrocrocins neben Crocin von Interesse. In den Narbenschenkeln des Safrancrocus konnte wie erwartet Picrocrocin nachgewiesen werden, überraschenderweise jedoch nicht in den anderen untersuchten Crocus-Sorten. Vom analytischen Standpunkt her ist zu bemerken, daß der Picrocrocin-Nachweis nach der hier angewendeten Methode sehr empfindlich und diese Verbindung somit auch beim Vorliegen kleinster Mengen zu erfassen ist (ab 0.06 µg mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer).

Nach diesen Befunden traten erhebliche Zweifel auf, ob es tatsächlich ein "Protocrocin" gibt, das sich aus Picrocrocin und Crocin aufbauen soll; um so intensiver wurde daraufhin auf den Chromatogrammen nach weiteren gelben Carotin-Zonen gesucht. Diese zeigten sich auch bei einigen Crocus-Sorten, am deutlichsten waren sie bei Crocus speciosus ausgebildet.

Das Ziel der weiteren Untersuchungen war es nun, diese Crocin-ähnlichen Substanzen zu charakterisieren, was durch die sehr geringen Mengen an Ausgangsmaterial erheblich erschwert wurde. Alle Versuche mußten deshalb im Ultramikromaßstab durchgeführt werden.

VIII. Zur Kennzeichnung neuer, Crocin-ähnlicher Stoffe

Bei der Chromatographie von Methanolextrakten (Kaltmazeraten) der Narbenschenkel von Crocus speciosus auf Cellulose-Schichten mit Äthylacetat-Pyridin-Wasser (40 + 20 + 40) [Oberphase] fielen 3 fast gleich stark gefärbte, gelbe Zonen auf. Die oberste Zone zeigte den gleichen hRf-Wert wie authentisches Crocin, bei den beiden unbekannten, mit X und Y bezeichneten Zonen lag dieser Wert niedriger (Abb.9, S.52).

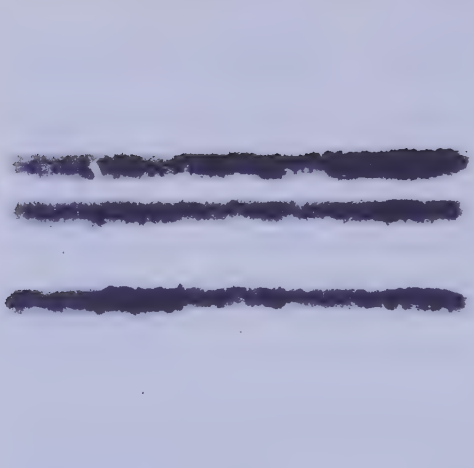


Abbildung 9. Dünnschicht-chromatographische Trennung des Methanolextraktes von Crocus speciosus

Crocin, hRf = 60
Substanz X, hRf = 50
Substanz Y, hRf = 35

Schicht: Cellulose MN_{300}
Fließmittel: Äthylacetat-Pyridin-Wasser (40 + 20 + 40), Oberphase
Laufhöhe: 15 cm

Die Anreicherung dieser 3 Substanzen erfolgte mittels präparativer DC. Die ausgeschabten Zonen wurden in kleine Säulen gegeben, eluiert und die Extinktionen bei 434 und 464 nm gemessen. Es zeigte sich, daß die 3 Substanzen dieselben Absorptionsmaxima (434 und 464 nm) und auch den gleichen Kurvenverlauf wie reines Crocin bzw. Crocetin haben. Hiernach darf man annehmen, daß sie die gleiche chromophore Gruppe aufweisen, wie sie im Aglykon Crocetin vorkommt. Da nach dc- und spektralphotometrischer Analyse die am weitesten gewanderte Substanz mit Crocin identisch ist, darf angenommen werden, daß die beiden darunterliegenden Substanzen X und Y Homologe des Crocins sind. Auch das

gleichartige Verhalten beim Besprühen mit Antimon(III)-chlorid- und Bortrifluorid-Reagens weist in diese Richtung. Es ist also anzunehmen, daß es sich bei den Substanzen X und Y um "Crocin-ähnliche" Verbindungen handelt, die sich nur im Zuckeranteil von der bisher unbekannten Substanz unterscheiden. Um diese Arbeitshypothese zu sichern und über Art sowie Verknüpfung der Zucker Aufschluß zu erhalten, war ein schonender Abbau angezeigt. Es wurde versucht, neben dem Aglykon die genuine Zuckerkomponente zu erfassen.

Eine Alkali-Spaltung erschien vorteilhafter, da hierbei – im Gegensatz zur Säurebehandlung – die vorhandenen Ätherbindungen nicht gespalten werden.

1) Das Aglykon Crocetin

Nach der Alkalibehandlung wurde das jeweilige lipophile, gelbe Aglykon mit Chloroform ausgeschüttelt, und die Spektren wurden aufgenommen. Sie waren mit denen des Crocetins identisch. Auch nach der DC ergab sich die Identität der 3 Aglyka (Abb.10).

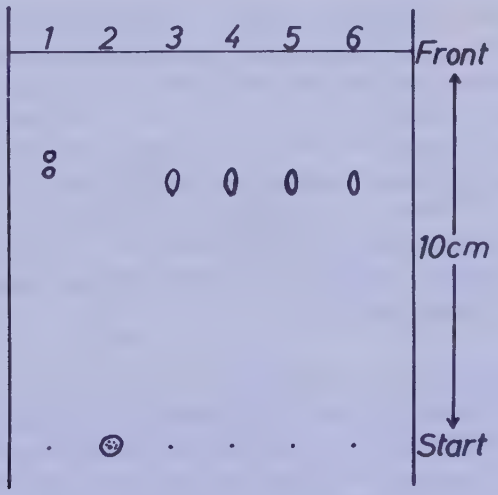


Abbildung 10. Dünnschicht-Chromatogramm der gelben, lipophilen Spaltprodukte

(Erläuterungen auf S. 54 oben)

1 Farbstoffgemisch der Fa.Desaga (Heidelberg)
2 Crocin als Vergleichssubstanz
3 authentisches Crocetin
4 Crocetin aus authent. Crocin
5 Crocetin, Substanz X
6 Crocetin, Substanz Y

Schicht: Kieselgel G (mit 2n Weinsäure imprägniert)
Fließmittel: Benzol-Äther (50 + 50)
Trennkammer: S-Kammer
Sprühreagens: Antimon(III)-chlorid

In der wäßrigen Phase blieben die Zucker zurück. Nach der Neutralisation wurden zunächst die Salze durch Filtration über Mischbett-Austauscher entfernt. Das wäßrige Filtrat wurde danach eingeengt und in Methanol aufgenommen; es konnte dann zur Chromatographie der Zucker verwendet werden.

2) Die Zucker

Zu ihrer Bestimmung waren allerdings eingehende Studien über optimale Trenn- und Nachweisbedingungen notwendig. Es kam hierbei speziell auf die Trennung von Gentiobiose, Saccharose, Glucose und Fructose an. Für die ersten Versuche konnten die von STAHL und KALTENBACH [62] beschriebenen Trennbedingungen mit Erfolg verwendet werden. Das entsprechende Chromatogramm (Abb. 11, S. 55) zeigt, daß erwartungsgemäß als Zuckeranteil beim Crocin hauptsächlich Gentiobiose nachweisbar ist, allerdings findet man auch kleine Mengen Glucose. Es ist anzunehmen, daß sie ein Spaltprodukt der Gentiobiose ist.

Der Zuckeranteil der Substanz X ergibt 3 Zonen. Die eine ist identisch mit Gentiobiose, die andere mit Glucose. Auf dem Chromatogramm erscheint jedoch ein weiterer Zucker, der nicht in der Vergleichslösung enthalten war und zwischen Startpunkt und Gentiobiose liegt. Der Zuckeranteil aus der Substanz Y besteht hauptsächlich aus diesem unbekannten Zucker (hRf = 30). Im Chromatogramm findet man daneben noch kleine Mengen Glucose und Fructose (Abbildung 11, S. 55).

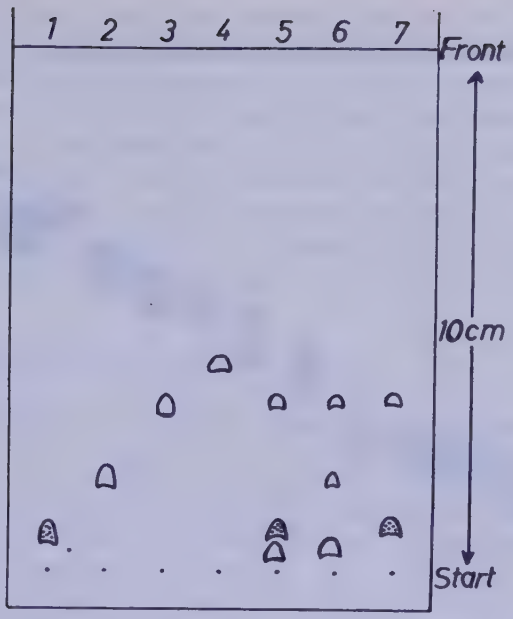


Abbildung 11. Dünnschicht-Chromatogramm der Hydrolysate

1 Gentiobiose (5 µg)
2 Saccharose (5 µg)
3 Glucose (5 µg)
4 Fructose (5 µg)
5 Zuckeranteil Substanz X
6 Zuckeranteil Substanz Y
7 Zuckeranteil Crocin

Schicht: Kieselgur G 0.02 m (imprägniert mit Na-acetat)
Fließmittel: Äthylacetat-Isopropanol-Wasser (65 + 23.5 + 11.5)
Sprühreagens: Anisaldehyd-Schwefelsäure

Die Identifizierung dieses unbekannten Zuckers wurde zunächst auf chromatographischem Wege versucht (Abbildung 12, S.56).

Abbildung 12. Dünnschicht-Chromatogramm verschiedener Zucker zu Vergleichszwecken

1	Stachyose	9	Galaktose
2	Planteose	10	Glucose
3	Raffinose	11	Fructose
4	Melizitose	12	Arabinose
5	Gentianose	13	Xylose
6	Gentiobiose	14	Rhamnose
7	Lactose	15	Ribose
8	Saccharose	16	Digitoxose

Aufgetragene Menge: 5 µg in Methanol

Schicht: Kieselgel G + Kieselgur G (1 + 4), mit 0,02m Na-acetat imprägniert

Fließmittel: Äthylacetat-Methanol-Wasser (65 + 27 + 9)

Sprühreagens: Anis-Aldehyd-Schwefelsäure

Dabei zeigte sich, daß eine sichere Aussage nicht möglich ist, da die Unterschiede der hRf-Werte im interessierenden Bereich zwischen Lactose und Planteose (vgl. Abb. 12) zu gering sind. Deshalb wurde nach anderen spezifischen Möglichkeiten gesucht, die Identität des unbekannten Zuckers im Ultramikromaßstab klarzustellen. Hierfür kamen insbesondere enzymatische Verfahren in Betracht. Diese waren nicht nur im Hinblick auf die Spaltung der in Frage kommenden Di- und Trisaccharide, sondern auch für die Spaltung des Crocins von Interesse.

IX. Enzymatische Methoden

1) Spezifischer Nachweis von ß-D-Glucose auf dem DC

Bei den bereits erwähnten Untersuchungen zur Kennzeichnung der Tri- und Disaccharide, die bei der Spaltung entstehen, wurde nach einer möglichst spezifischen Nachweismethode für die entstehenden Komponenten gesucht.

In Anlehnung an die heute in der klinischen Diagnostik weit verbreiteten enzymatischen Schnellverfahren zur Bestimmung der Glucose wurde versucht, diese Enzymreaktion auf die Platte zu übertragen.

> LEUTHARDT und WOLF [39] haben auf einem Papierchromatogramm Saccharose nachgewiesen, indem sie es mit einer 5proz. Hefe-Suspension besprühten und anschließend sowohl Glucose als auch Fructose nachweisen konnten.

Zunächst wurden mit den handelsüblichen Glucotest^{R}-Streifen Versuche durchgeführt. Hierzu wurden die Teststreifen angefeuchtet und auf dem Chromatogramm mit einer Glasplatte angepreßt. Schon dabei zeigte sich, daß dieser Nachweis gelingt. Der Teststreifen färbte sich nur bei Glucose blau an. Dieser Reaktion liegt folgendes Schema zugrunde:

$$\text{D-Glucose} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Gluconat} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{Leukofarbstoff} \xrightarrow{\text{POD}} 2\ H_2O + \text{Farbstoff}$$

GOD = Glucoseoxidase
POD = Peroxidase

Weitere Versuche zeigten, daß es noch vorteilhafter ist, die Enzyme und den Farbstoff direkt auf das Chromatogramm zu sprühen. Dabei erhält man gut lokalisierte Zonen der Glucose. Dieses Verfahren wurde unabhängig von WHITE und SECOR [75] sowie von MARTINSON [43] für die Chromatographie entwickelt.

Weiterhin wurden Nachweisempfindlichkeit und Spezifität untersucht. Auf eine mit Natriumacetat imprägnierte Kieselgel-G-Kieselgur-G-Mischschicht wurden steigende Anteile (von 0.05 bis 30 µg) einer methanolischen Glucose-Lösung aufgetragen und chromatographiert. Nach sorgfältigem Abdampfen des Fließmittels wurden Farbstoff-Lösung und die frisch bereiteten Enzym-Lösungen (S. 57) aufgesprüht und 5 Minuten bei 35° im Brutschrank belassen. Nach etwa 2 - 3 Minuten begannen sich im Rf-Bereich der Glucose blaue Flecke auf dem Chromatogramm zu bilden. Die Intensität der Anfärbung blieb während einer Stunde erhalten.

Die Nachweisgrenze für Glucose liegt unter den vorgenannten Bedingungen bei 0.05 µg.

Tabelle 9. Enzymreaktionen verschiedener Kohlenhydrate

Substrat	Aufgetragen in µg	Reaktion mit "GOD-Reagens"*)
Mannose	10.0	keine
Xylose	10.0	keine
Galaktose	10.0	keine
Gentiobiose	20.0	keine
Gentianose	20.0	keine
Glucose	5.0	++++
Glucose	0.1	++
Glucose	0.05	+
Harn (Diabetiker)	0.7 (in 1 µl)	++
Blutserum (")	1.0 (in 1 µl)	++
Crocus Ø DHU	? (in 5 µl)	++
Bryonia Ø DHU	? (in 5 µl)	++

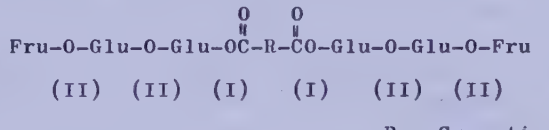
*) GOD-Reagens bedeutet hier GOD + POD + Leukofarbstoff (o-Tolidiniumchlorid, Merck).

Dieser enzymatische Nachweis bewährt sich bei der Untersuchung von Pflanzenextrakten ebenso wie bei biologischen Flüssigkeiten. Andere Zucker geben mit Glucoseoxidase (GOD) und Peroxidase (POD) in Verbindung mit einem Leukofarbstoff in der angegebenen Konzentration keine Reaktion (vgl. Tab. 9, S. 58).

Um festzustellen, ob eine Abhängigkeit zwischen Sorptionsmittel und Empfindlichkeit des Nachweises mit dem "GOD-Reagens" besteht, wurde die untere Nachweisgrenze auf Cellulose-MN-300-Schichten ermittelt; sie lag bei 0.08 µg Glucose.

2) Enzymatische Spaltung von Crocin und Kohlenhydraten

Neben den schon beschriebenen Möglichkeiten, die verschiedenen "Crocine" mittels Säure oder Lauge zu spalten, schienen Versuche mit spezifischen Enzymen sinnvoll, um Näheres über Art und Verknüpfung der Zucker zu erfahren. Jedoch konnte zur Spaltung des Crocins nur ein Enzym Verwendung finden, welches, wie bei der Alkali-Spaltung, lediglich die Esterbindung (I) zwischen Aglykon und Zucker-Komponente spaltet ohne aber die Ätherbindungen (II) von Di- und/oder Trisacchariden anzugreifen.



Es ist wahrscheinlich, daß im Safrancrocus Hydrolasen vom Esterase- und Glucosidase-Typ vorhanden sind; darauf weist die Tatsache hin, daß in länger gelagerter Droge Crocetin und ß-Hydroxycyclocitral sowie etwas Gentiobiose neben Glucose gefunden werden. In ganz frischer, nichtgetrockneter Droge wurde dagegen keine Gentiobiose und nur sehr wenig freie Glucose nachgewiesen.

> PERROT und GORIS [50] nahmen an, daß in den Zellen pflanzlicher Drogen neben oxydierenden auch hydrolysierende Enzym-Systeme vorkommen, die u.a. Wirkstoffe verändern können. Unter geeigneten Bedingungen gelingen "in vitro" mit isolierten Enzymen ebenfalls Spaltungen, wie JACOBS und HOFFMANN [26] zeigten. Sie isolierten aus den Samen von Strophanthus courmontii das Enzym Strophanthobiase und konnten damit an k-Strophanthin-ß und anderen isolierten Glykosiden aus Strophanthus kombé gezielte Spaltungen

an der Zuckerkette vornehmen. Später haben die Arbeitskreise von REICHSTEIN [51], STOLL [65] und TSCHESCHE [67] bei ihren Untersuchungen mit großem Erfolg die schonende enzymatische Spaltmethode angewendet.

Bei der Isolierung von genuinen Glykosiden aus Pflanzenmaterial zu analytischen und/oder therapeutischen Zwecken ist die Inaktivierung [63] der in den Pflanzen vorhandenen Enzyme wichtig, da sie einzelne Zucker abspalten können und dadurch Sekundärprodukte erhalten werden.

Ein Enzym vom Hydrolasen-Typ ist für Crocus sativus L. nicht bekannt; eigene Versuche mit Acetonextrakten ergaben ebenfalls keine Hinweise. So wurden Vorversuche zur enzymatischen Spaltung mit Luizym® *) an authentischem Crocin als Substrat in gepufferter Lösung bei 55° durchgeführt. Dies erschien gerade im Hinblick auf die Untersuchungen von TSCHESCHE und Mitarb. [68] am Uzarin aussichtsreich, da sie beim Herzglykosid eine vollständige Spaltung der Sequenz Glucose-Glucose erzielt hatten.

Wie erwartet waren die Esterbindungen des Crocins durch die Hydrolasen des Enzymgemisches nach 12stdg. Inkubationszeit quantitativ gespalten, ebenso auch die Ätherbindungen der beiden endständig gruppierten Gentiobiose-Moleküle. Bei der dc-Kontrolle konnte Glucose als einziger Zucker nachgewiesen werden.

In weiteren Versuchen wurden zunächst die in Tab. 10 (s. 61) aufgeführten Enzyme mit Zuckern und Crocin auf ihre Verwendbarkeit geprüft.

Bei diesen Versuchen konnte in der Esterase P (Merck) ein Enzym gefunden werden, das die damit inkubierten Zucker nicht spaltet, wohl aber die Esterbindungen (vgl. Schema S.59) zwischen Aglykon und den beiden Gentiobiose-Resten. Hierbei wurde auch die optimale Inkubationszeit ermittelt (Tab. 11, S. 61).

*) Luizym® ist ein Enzympräparat des Handels aus Aspergillus oryzae und enthält Proteasen, Cellulasen (α- und ß-Glykosidasen) sowie Diastase (Privatmitt. der Medizinisch-Wissenschaftlichen Abteilung der Luitpold-Werke, München).

Tabelle 10. Spaltung einiger Di- und Trisaccharide mit verschiedenen Enzymen

Substrat	Zusatz von	Nachgewiesener Zucker
Gentianose	Puffer	Gentianose
	Esterase P	Gentianose
	ß-Amylase	Saccharose + Glucose
	ß-Glucosidase	Saccharose + Glucose
	Hydrolasengemisch	Glucose + Fructose
	Invertase	Glucose + Fructose + Gentiobiose
Gentiobiose	Puffer	Gentiobiose
	Esterase P	Gentiobiose
	ß-Amylase	Glucose
	ß-Glucosidase	Glucose
	Hydrolasengemisch	Glucose
	Invertase	Gentiobiose
Saccharose	Puffer	Saccharose
	Esterase P	Saccharose
	ß-Amylase	Saccharose
	ß-Glucosidase	Saccharose
	Hydrolasengemisch	Glucose + Fructose
	Invertase	Glucose + Fructose

Tabelle 11. Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Hydrolyse des Crocins mit verschiedenen Enzymen

Temperatur: 29°, Puffer: Phosphat, pH: 7.1; es bedeuten: - = negativ, + = schwacher positiver Nachweis, ++ = guter positiver Nachweis, +++ = sehr guter positiver Nachweis.

Enzym	Zucker*)	in 60	120	180	240	300	360	420	840 Min.
Esterase	a	-	-	-	+	+	+	+	+
	b	-	+	+	++	++	++	+++	+++
	c	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetylcholin-esterase		keine Spaltung							
α-Amylase		keine Spaltung							
ß-Amylase	a	-	+	++	++	+++	+++	+++	+++
	b	-	-	(+)	-	-	-	-	-
	c	-	-	-	-	-	-	-	-
ß-Glucosidase	a	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
	b	-	-	-	-	-	-	-	-
	c	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolasenge-misch	a	(+)	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
	b	-	-	-	-	-	-	-	-
	c	-	-	-	-	-	-	-	-
Invertase		keine Spaltung							
Pufferlösung		keine Spaltung							

*) a = Glucose
b = Gentiobiose
c = Saccharose

Die dc Kontrolle aliquoter Teile der Crocin-Hydrolysen erfolgte stündlich. Das charakteristische Verhalten und die Reaktion mit mehreren Sprühreagentien wurde auf verschiedenen Schichten mit unterschiedlichen Fließmitteln geprüft. Nach Beendigung dieser Testreihen wurden die Ansätze mit Chloroform ausgeschüttelt und die Färbungen beider Phasen festgestellt (Tab. 12). Hatte eine Spaltung stattgefunden, war der Chloroformextrakt gelb gefärbt, die wäßrige Phase farblos.

Tabelle 12. Färbungen der Wasser- und Chloroform-Phasen von Enzymspaltungen des Crocins

Enzym	Färbung (Chloroform-Phase)	Färbung (wäßrige Phase)
Esterase P (Merck)	gelb-trübe	farblos
Acetylcholinesterase	farblos	gelb
α-Amylase	farblos	gelb
ß-Amylase	gelb-klar	farblos
Hydrolasengemisch	gelb-klar	farblos
ß-Glucosidase	gelb-trübe	fast farblos
Invertase	farblos	gelb
Puffergemisch	farblos	gelb

Unerwarteterweise zeigte auch ß-Amylase eine Spaltung, was durch mangelnde Reinheit des Enzyms erklärt werden könnte. Nach dem Ausschütteln des Esterase-P-Ansatzes mit Chloroform konnten in der lipophilen Phase Crocetin dc wie auch spektralphotometrisch, in der wäßrigen Phase Gentiobiose nachgewiesen werden. Dieser Versuch zeugte, daß Esterase P das Crocin wie erwartet spaltet; es konnte daher zur Hydrolyse der Crocine X und Y verwendet werden.

a) Spaltung der Crocine mit Esterase P

Nachdem die optimalen Spaltbedingungen ermittelt waren (Tab. 11, S.61), wurden die wäßrigen gelben Lösungen der Crocine mit Esterase P inkubiert. Die Spaltung war nach 7 Stunden beendet. Das lipophile, gelbe Aglykon wurde mit Chloroform ausgeschüttelt und, wie oben beschrieben, weiter untersucht. Dabei

ergab sich Übereinstimmung mit den Versuchen der Alkali-Spaltung. Die abgetrennten wäßrigen Phasen, die die Zucker enthielten, wurden nach Entsalzung und schonendem Einengen dc untersucht; vgl. Abbildung 13.

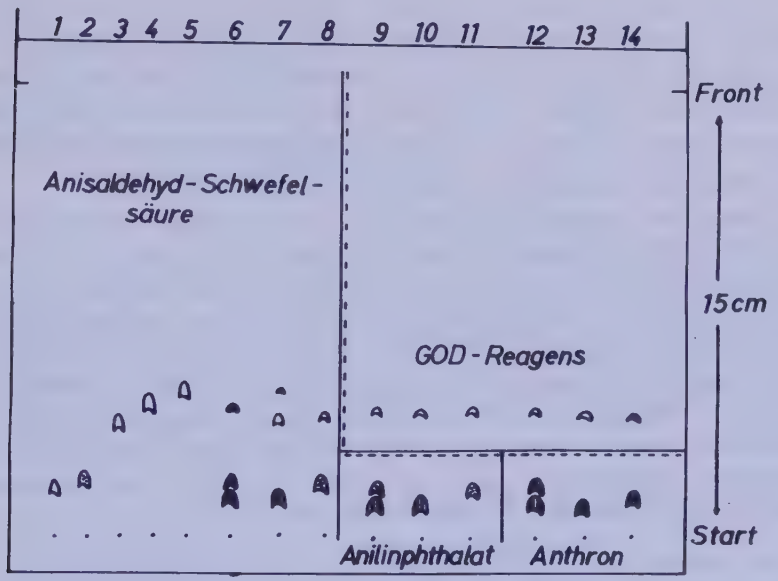


Abbildung 13. DC der wäßrigen Phasen der Crocine nach enzymatischer Spaltung

1	Gentianose	6, 9, 12	Crocin X	Schicht: Kieselgel G-Kieselgur G (1 + 4), mit 0.02 m Na-acetat imprägniert
2	Gentiobiose	7, 10, 13	Crocin Y	
3	Saccharose	8, 11, 14	Crocin	
4	Glucose			
5	Fructose			

Fließmittel: Äthylacetat-Methanol-Wasser (68 + 23 + 9)

Es wurden 4 Sprühreagentien nacheinander eingesetzt(Kennzeichnung durch Striche), wobei die andern Partien abgedeckt waren:

1) Anisaldehyd-H_2SO_4
2) "GOD-Reagens"
3) Anilinphthalat
4) Anthron

Das Chromatogramm (Abb. 13, S.63) zeigt die zum Vergleich aufgetragenen Zucker (1 - 5) sowie die wäßrigen Phasen (6 - 14), die mit den angegebenen Reagentien in bestimmter Reihenfolge besprüht wurden.

An den Startpunkten 6, 9 und 12 wurden die wäßrigen Hydrolysate von Crocin X, bei 7, 10 und 13 die von Crocin Y sowie bei 8, 11 und 14 die des klassischen Crocins zu gleichen Teilen aufgetragen. Nach dem Entwickeln wurde das Chromatogramm zuerst im Bereich der Startpunkte 1 - 8 mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens besprüht. Die erhitzte Platte ergab folgendes Bild:

Die Vergleichslösungen der Zucker (1 - 5) wie auch die Hydrolysate der 3 Crocine sind sehr gut getrennt. Bei Crocin X (6) ist ein polarerer Zucker (pZ; hRf = 10) zwischen Gentiobiose (hRf = 15) und Startpunkt zu erkennen sowie ein weiterer Zucker, bei dem es sich um Glucose handeln kann.- Am Startpunkt 7 (Crocin Y) erkennt man wieder den gleichen pZ wie bei (6) sowie 2 weitere Zucker, von denen der mittlere Saccharose und der am weitesten gewanderte Glucose sein kann.- Das Hydrolysat des klassischen Crocins bei Startpunkt 8 zeigt das erwartete Bild, nämlich Gentiobiose (hRf = 15) neben wenig Glucose.

Die Zucker der Enzymlösungen werden auf dem Chromatogramm gegenüber den Vergleichslösungen etwas zurückgehalten; dadurch kommt es besonders an Startpunkt 7 zwischen der vermuteten Saccharose und Glucose zur Überlappung der Flecke. Um vorhandene Glucose sicher nachzuweisen, wurde das Chromatogramm zwischen den Startpunkten 9 - 14 und dem hRf-Wertbereich 20 - 100 mit dem spezifischen Glucosidase-Reagens (GOD) behandelt. Dabei konnte in jedem Falle ein positiver Glucose-Nachweis erhalten werden. Im Anschluß daran wurde der Chromatogramm-Teil unterhalb hRf = 20 der Startpunkte 9 - 11 mit Anilinphthalat-Reagens und der Punkte 12 - 14 mit Anthron-Reagens besprüht. Auch hier ergaben sich positive Zonen wie bei 6, 7 und 8.

Zusammengefaßt, ergab die enzymatische Hydrolyse der "Crocine" folgende Ergebnisse auf der Platte:

Crocin X	1) polarerer Zucker (pZ) (Gentianose ?, s.S. 67)	
	2) Gentiobiose	
	3) Glucose	(als Spaltprodukt der Gentiobiose)
Crocin Y	1) polarerer Zucker (pZ) Gentianose ?, s.S. 67)	
	2) Saccharose	
	3) Glucose	(als Spaltprodukte der Gentianose?)
klassisches Crocin	1) Gentiobiose	
	2) Glucose	(als Spaltprodukt der Gentiobiose)

Es kann somit postuliert werden, daß Crocin X einmal die Zukkerkomponente Glucose-Glucose = Gentiobiose sowie Glucose-Glucose-Fructose = Gentianose endständig besitzt und somit asymmetrisch ist, was auch seine Lage im Chromatogramm gegenüber Crocin Y erklären würde, dem endständig zwei Gentianose-Moleküle zugeordnet werden könnten.

α) Erneute Spaltung der wäßrigen Phasen zur Identifizierung der Zuckerkomponenten

Eine Anreicherung des Zuckers pZ für weitere Analysen war wegen der geringen Substanzmenge nicht möglich. Das Ziel der folgenden Untersuchungen zur Identifizierung des vorläufig mit pZ bezeichneten Zuckers war es, mit spezifischen Enzymen gezielt weiter zu spalten, um auf diese Weise Anhaltspunkte über die Verknüpfung sowie die Einzelkomponenten zu erhalten. Dazu wurden aliquote Mengen der wäßrigen Phase des gespaltenen Crocins X sowie des gespaltenen Crocins Y unter den auf S. 62 beschriebenen Versuchsbedingungen mit den folgenden Enzymen inkubiert:

1) Esterase P
2) ß-Glucosidase
3) Invertase
4) Hydrolasengemisch
5) Pufferlösung (Kontrolle)

Nach Reinigung der Ansätze, die genau wie bei der Spaltung des Crocins durchgeführt wurden, konnten die chromatographischen Daten ausgewertet werden (Tab. 13, S.66).

Tabelle 13. Gezielte Spaltung der wäßrigen Phasen von Crocin X und Y mit verschiedenen Enzymen

Enzym wäßr.Phase von	nach hRf-Wert gefunden	Nachweis mit Reagens*) 1	2	3	4
Esterase P					
Crocin X	Glucose	blaugrün	grau	bräunl.	hellblau
	Gentiobiose	blaugrün	grau	bräunl.	hellblau
	Gentianose	blaugrün	grau	braun-rot	hellblau
Crocin Y	Glucose	blaugrün	grau	bräunl.	hellblau
	Saccharose	violett	graugrün	bläul.	-
	Gentianose	blaugrün	graugrün	bräunl.	-
ß-Glucosidase					
Crocin X	Glucose	blaugrün	grau	bräunl.	hellblau
	Saccharose	violett	graugrün	bläul.	-
Crocin Y	Glucose	blaugrün	grau	bräunl.	hellblau
	Saccharose	violett	graugrün	bläul.	-
Invertase					
Crocin X	Fructose	blauviol.	blau	bläul.	-
	Gentiobiose	blaugrün	grau	bräunl.	-
Crocin Y	Fructose	blauviol.	blau	bläul.	-
	Gentiobiose	blaugrün	grau	bräunl.	-
Hydrolasengemisch					
Crocin X	Glucose	blaugrün	grau	bräunl.	hellblau
	Fructose	blauviol.	blau	bläul.	-
Crocin Y	Glucose	blaugrün	grau	bräunl.	hellblau
	Fructose	blauviol.	blau	bläul.	-
Puffergemisch					
Crocin X	keine Spaltung				
Crocin Y	keine Spaltung				

*) Reagentien: 1 = Anisaldehyd-Schwefelsäure; 2 = Anthron; 3 = Anilinphthalat nach Betrachten im langwelligen UV-Licht bei 366 nm; 4 = "GOD".

Die in Tabelle 13 (S.66) zusammengefaßten Ergebnisse zeigen bei der Spaltung mit

1) Esterase P die schon auf S. 65 beschriebenen Ergebnisse; neben dem Zucker pZ werden Gentiobiose und Glucose gefunden;

2) ß-Glucosidase Glucose und Saccharose in beiden Lösungen (X und Y);

3) Invertase das Vorkommen von Fructose neben Gentiobiose und

4) Hydrolasengemisch, daß die Zuckerkomponenten in die Hexosen Glucose und Fructose gespalten werden.

Auf Grund der erhaltenen Zuckeranteile darf angenommen werden, daß der bisher mit pZ bezeichnete Zucker mit dem Trisaccharid Gentianose identisch ist, welches die Sequenz

$$-Glu\overset{(\beta)}{-}Glu\overset{(\alpha)}{-}Fru$$

besitzt.
Die Zucker von Crocin X bestehen aus je 1 Mol Gentiobiose und Gentianose, diejenigen von Crocin Y aus je 2 Molen Gentianose.

Damit ist erwiesen, daß neben dem klassischen Di-Gentiobiosid Crocin auch noch ein Di-Gentianosid (Crocin Y) und ein Gentiobiose-Gentianosid (Crocin X) vorkommt, das quasi eine Mittelstellung zwischen dem reinen Gentiobiosid und dem entsprechenden Di-Gentianosid einnimmt.

X. Verteilung der Crocine in heimischen Crocus-Sorten

Es erschien nun interessant, Vorkommen und Verteilung der Crocine in den Narbenschenkeln verschiedener Crocus-Sorten festzustellen. Zur Untersuchung wurden jeweils frische Narbenschenkel mit Methanol extrahiert und die Extrakte direkt auf Cellulose-Schichten chromatographiert. Die Herstellung der Extrakte und das Auftragen waren jeweils unter denselben Bedingungen ausgeführt worden, um einen halbquantitativen Vergleich zu erhalten.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 (S. 68) zusammengefaßt.

Tabelle 14. Vorkommen von Crocin, Crocin X und Y in den Narbenschenkeln heimischer Crocus-Sorten

Name	Crocin	Crocin X	Crocin Y
Crocus aureus	++	++	++
Crocus biflorus	–	+	+
Crocus zonatus	–	+	+
Crocus ancyrensis	–	–	+
Crocus pulchellus	+	+	+
Crocus speciosus	++	++	++
Crocus sieberi	–	–	+
Crocus imperati	+	+	+
Crocus versicolor picturatus	++	++	+++
Crocus sativus L.	+++	–	–
Crocus "Große Gelbe"	+	–	–
Crocus "Kleine Gelbe"	+	–	–
Crocus "Jeanne d'Arc"	–	+	++
Crocus "Violet Vanguard"	+	+	++

Zeichenerklärung s.Tab. 11, S.61.

Aus der vorstehenden Tabelle geht hervor, daß es Crocus-Sorten gibt, die alle 3 Crocine in annähernd gleichen Mengen enthalten (C.aureus, C.speciosus und C.versicolor picturatus). Daneben gibt es auch solche, in denen nur Crocin X und Y vorkommen. Im Safrancrocus fehlen die Crocine X und Y, hier kommt lediglich das klassische Crocin vor. Somit wird auch verständlich, daß KUHN bei seinen Untersuchungen diese Verbindungen (X und Y) nicht finden konnte.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Oberassistent Dr.H.-L. Schmidt und Herrn Dr.G. Rohns, Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes, sowohl für Anleitung und Unterstützung bei den enzymatischen Arbeiten als auch für ihre stete Diskussionsbereitschaft besonders danken.

XI. Quantitative Erfassung von Crocin und Picrocrocin im Safran

In der pharmakologischen Literatur findet man vorzugsweise Angaben über die mißbräuchliche Verwendung von Safran zu abortiven Zwecken (vgl.auch S. 7 f.). Jedoch sind die dort aufgeführten "wirksamen" Mengen sehr verschieden. Da angenommen werden kann, daß das abortiv wirksame Prinzip des spanischen Safrans das Picrocrocin oder seine Zerfalls- bzw. Spaltprodukte (s.S.16) sind, sollte eine quantitative Bestimmungsmethode nach vorheriger dc Trennung eines methanolischen Gesamtextraktes der Droge ausgearbeitet werden.

Als neue und einfache Methode bot sich die direkte quantitative Bestimmung des Picrocrocins wie auch des Crocins auf der dc Platte mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer der Fa.Zeiss an. Hierüber liegt im Arbeitskreis von STAHL [59] und JORK [27, 28] ein größeres Erfahrungsmaterial vor, das hier mitbenutzt werden konnte

Um für diesen speziellen Fall festzustellen, ob sich die beiden Substanzen während des Meßvorganges zersetzen, wurden auf die jeweiligen Trennschichten bestimmte Mengen der Substanz aufgetragen und diese in ihrem Absorptionsmaximum bestrahlt. Die zeitliche Änderung der Absorption wurde gemessen und mit einem Schreiber aufgezeichnet.

Von Crocin wurden 0.6 µg aufgetragen und in ihrem Absorptionsmaximum bei 455 nm auf der Platte 2 Stunden lang bestrahlt. Unerwarteterweise trat kein Zerfall ein. Picrocrocin, bei 252 nm bestrahlt, zeigte dagegen nach einstündiger Bestrahlung zwar einen geringen, aber meßbaren Zerfall. Es kann angenommen werden, daß

1) unter dem Einfluß intensiver UV-Strahlung Photolyse und/oder
2) Protolyse des Picrocrocins mit nachfolgender Dimerisierung eintritt, die durch das saure Milieu des Kieselgels bedingt ist.

Im Laufe dieser Messungen war es für weitere Untersuchungen von Interesse, das Verhalten der Picrocrocin-Derivate Safranal und ß-Hydroxycyclocitral unter den gleichen Bedingungen zu untersuchen. Dabei zeigte sich, daß diese beiden Substanzen, besonders aber das Safranal, gegenüber der UV-Strahlung weitaus empfindlicher sind als Picrocrocin (Abb. 14).

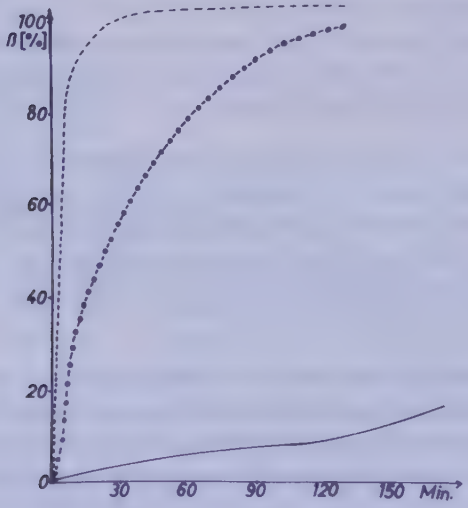


Abbildung 14. Zerfallskurven von Picrocrocin, ß-Hydroxycyclocitral und Safranal unter UV-Strahlung

——— Picrocrocin, gemessen bei 252 nm
•–•–•ß-Hydroxycyclocitral, gemessen bei 255 nm
---- Safranal, gemessen bei 240.5 nm

Abbildung 14 zeigt, daß die durch Konjugation von 3Δ entstandene π-Elektronenwolke des Safranals erwartungsgemäß am schnellsten angegriffen wird. Auch die H—O-Bindung im ß-Hydroxycyclocitral ist photolytisch spaltbar; das dabei zunächst gebildete O•-Radikal sollte dann leichter zerfallen können. Der Glucosyl-Rest vom Picrocrocin ist dagegen wesentlich schlechter

abzuspalten. Die beobachtete langsame Zersetzung könnte in diesem Falle möglicherweise durch Proteolyse bewirkt worden sein.

Nachdem auf Grund dieser Voruntersuchungen die Möglichkeit gegeben war, Crocin und Picrocrocin mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer der Fa.Zeiss auf dem Chromatogramm zu bestimmen, wurde mit der quantitativen Auswertung begonnen.

Zur Crocinbestimmung diente die Geräteanordnung M-Pr [83], d.h. die Chromatogramm-Zone wurde senkrecht bestrahlt und von dem diffus reflektierten Licht der Anteil gemessen, der unter einem Winkel von 45° remittiert wird.- Picrocrocin wird auf einer fluorescierenden Schicht bestimmt, deshalb wird die Geräteanordnung Pr-M gewählt. In diesem Falle werden Leuchte und Empfänger am Gerät vertauscht; dabei hat der Monochromator die Aufgabe, als selektives Filter zu dienen.

Als Bezugssystem wird in beiden Fällen die Sorptionsschicht in Nähe der Substanz auf jener Platte gewählt, die gemessen werden muß; das Chromatogramm soll daher frei von anderen Substanzen und Fließmittel-Resten sein. Die Schicht muß möglichst homogen, d.h. sie soll blasenfrei sein und überall die gleiche Dicke haben [28].

Da bei der DC der Faktor der äußeren Einflüsse, wie Aktivität der Platten, Zusammensetzung des Fließmittels, Luftfeuchtigkeit u.s.w. nicht unerheblich ist, muß die Substanz, die gemessen werden soll, zusammen mit der Vergleichssubstanz auf einer Platte aufgetragen werden. Letztere muß dazu in mehreren Konzentrationen aufgebracht werden, um eine exakte Eichkurve aufstellen zu können.

Crocin und Picrocrocin waren in 15 handelsüblichen Safransorten verschiedener Jahrgänge, Ernten und Trocknungsmethoden zu bestimmen. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 30 sehr schonend getrocknete und pulverisierte Narbenschenkel; 30 bis 50 mg des Pulvers wurden in Methanol kalt mazeriert. Die intensiv rot gefärbte Lösung konnte dann zum Auftragen mit einer geeichten Mikrospritze verwendet werden, wenn die noch darin befindlichen Teile des Gewebes farblos waren.

Tabelle 15. Bestimmung von Crocin und Picrocrocin in 15 verschiedenen Safran-Sorten

C.sativus Handelsname	Ernte-jahr	Einwaage [mg]	%-Gehalt[a] Crocin	%-Gehalt[a] Picrocrocin	Molverh.Picro crocin:Crocin
Mancha	1963	32.80	11.28	8.85	1:2.3
Graecus	1962	36.20	12.51	6.82	1:2.03
Sierra superior	1962	35.35	8.04	4.54	1:1.67
Aragon Sierra	1963	34.10	9.16	5.58	1:1.80
Aragon Rio	1963	33.50	8.82	3.62	1:1.53
? (ca.30 Jahre alt)	1935?	36.40	1.92	0.05	1:1.54
Azafran Murcia[b]	1965	35.80	10.58	7.77	1:2.17
Las Palmeras[b]	1965	33.20	10.39	6.53	1:1.86
unbekannt	?	39.20	8.51	5.66	1:1.97
La Gineta	1963	36.30	14.40	8.31	1:1.71
La Gineta	1964	33.80	15.16	12.92	1:2.52
La Gineta [c]	1964	38.80	11.02	10.15	1:2.72
"electus"[d]	1963	33.60	6.09	2.72	1:1.32
"electus"[e]	1962	34.50	8.67	4.70	1:1.60
"electus"	1963	33.60	6.69	3.95	1:1.75

a) Bez. auf Trockengewicht.
b) Luftgetrocknet.
c) Frische Droge, direkt nach der Ernte über Blaugel getrocknet.
d) Müggenburg, Hamburg.
e) Caesar u.Loretz, Hilden.

Wie aus Tabelle 15 und Abbildung 15 (S.73) hervorgeht, kann der Crocin-Gehalt in den 15 untersuchten Handelsdrogen zwischen 1 und 15% liegen. Für eine gute Ware wird man danach einen Carotin-Gehalt von über 8% fordern können.

Der Picrocrocin-Gehalt kann ebensolchen Schwankungen unterliegen; es wurden Werte im Bereich von 0.05-13% gefunden. Eine deutliche untere Grenze läßt sich hier schlecht angeben; allerdings liegen die meisten Werte über 4%.

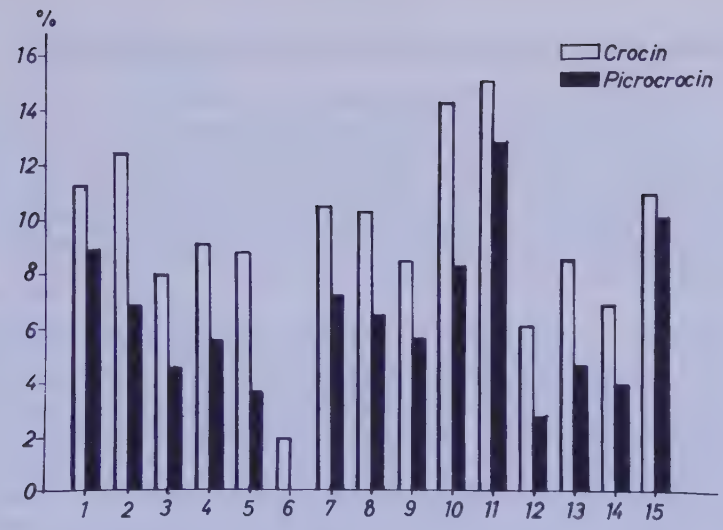


Abbildung 15. Prozentgehalt an Crocin und Picrocrocin in 15 handelsüblichen Drogen

Im Hinblick auf das von KUHN [37] postulierte Protocrocin ist das molare Verhältnis Crocin/Picrocrocin wichtig. Er fordert nämlich, daß aus 1 Mol. des hypothetischen Protocrocins 1 Mol. Crocin und 2 Moll. Picrocrocin entstehen sollen. KUHN und WINTERSTEIN [37] fanden bei ihren Untersuchungen, daß in den Narbenschenkeln von Crocus satívus L. Crocin und Picrocrocin im Molverhältnis 1:1.5 bis 2 enthalten sind; in frischer Droge wurde ein besseres "1:2"-Verhältnis vermutet.

Die aus den Werten der Tab. 15 (S.72) errechneten molaren Verhältnisse Crocin/Picrocrocin liegen zwischen 1:1.3 und 1:2.7. Bei Verhältniswerten unter 1:2 kann man u.U. annehmen, daß hier bereits eine teilweise enzymatische Spaltung von Picrocrocin stattfand. Nicht im Einklang mit der Protocrocin-Hypothese stehen jedoch die Werte über 1:2.0. Mit anderen Worten, es geht auch aus dieser Untersuchung hervor, daß eine gemeinsame, höhermolekulare Vorstufe nicht existiert, wie dies auch die geschilderten chromatographischen Versuche auf S.25a gezeigt haben.

1) Quantitative Bestimmung der Zucker in Crocin und Picrocrocin

Neben der qualitativen dc Identifizierung der einzelnen Zucker der Crocine und des Picrocrocins nach der Spaltung und/oder dem Zerfall wurde nun die Anthron-Methode zur quantitativen Bestimmung herangezogen, wie sie von COOPER und STAHL [11] beim Paeoniflorin bereits angewendet wurde.

Da Crocin und Safranal mit Anthron-Reagens eine Blaufärbung geben, mußte die zur Messung verwendete Crocin- und Picrocrocin-Lösung erst von diesen Substanzen befreit werden (saure Spaltung, Dichlormethan-Extrakt). Mit einer eingestellten Glucose-Lösung wurde dann eine Eichkurve aufgestellt, die für beide Zuckerlösungen als Vergleich diente. Die spektralphotometrische Messung wurde bei der Wellenlänge 625 nm und Glucose-Konzentrationen von 0 - 250 µg durchgeführt.

Berechnete und gefundene Glucose-Mengen von Crocin und Picrocrocin pro 1000 µg:

Crocin: ber. 737.0 µg, gef. 685.7 µg = 92.4% d.Th.*)
Picrocrocin: ber. 545.1 µg, gef. 495.5 µg = 90.9% d.Th.*)

Bei den Untersuchungen konnten also mit der Anthron-Methode die erwarteten Zuckermengen mit einem relativen Fehler von ca. 10% gefunden werden.

*) Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils 8 Bestimmungen.

XII. Vorkommen von Saponinen in verschiedenen Crocus-Sorten

Über Vorkommen und Verteilung der Saponine in Crocus ist nur wenig bekannt [71]. Erst seit 1961 ist ein spezifischer Nachweis von Saponinen im Mikromaßstab direkt auf der Platte möglich, der von STAHL und Mitarbb. [64] so entwickelt wurde, daß nach der Chromatographie das Fließmittel quantitativ von der Platte abgedampft und anschließend mit Blut-Gelatine überschichtet wurde.

Zonen von Saponinen bildeten auf der dc Platte "hämolytische Höfe" und waren daher gut zu erkennen. Versuche ergaben, daß es wenig sinnvoll ist, das Blut direkt auf die Platte zu sprühen, da hierbei die Schicht beschädigt und eine Bildung der "hämolytischen Höfe" unmöglich wird.

Die Anwendung aggressiver Sprühreagentien, wie sie TSCHESCHE und Mitarbb. [68] bei ihren Untersuchungen an Saponinen erprobten, war in unserem Falle nicht angezeigt, da diese Reagentien keinen Hinweis auf die hämolytischen Eigenschaften der getrennten Substanzen geben.

Saponine können sowohl als Glykoside wie auch als deren Aglyka, den Sapogeninen, in der Pflanze vorkommen. ZIMMERMANN [83] hat daruf hingewiesen, daß in vielen Fällen Triterpene in Form ihrer Säuren zusammen mit Pflanzenfarbstoffen, vorzugsweise Carotinen und Anthocyanen, in Blüten und Früchten vorkommen. Auch sie werden bei der Biosynthese über das Farnesylpyrophosphat, einen C_{15}-Körper [19, 46], in der Pflanze gebildet.

Zur Verteilung der Saponine in Knollen, Staubgefäßen und Narbenschenkeln des Crocus wurden Methanolextrakte der einzelnen frischen Pflanzenorgane (10:1) hergestellt und auf Kieselgel-G-Schichten mit Isopropanol-Wasser-Ameisensäure (80 + 15 + 5) getrennt. Um einen Vergleich für vorkommende Saponine zu haben, wurden Saponin (Merck) und Saponin-haltige Tinkturen mit aufgetragen. In Abbildung 16 (S. 76) sind Methanolextrakte von Knollen, Staubgefäßen und Narbenschenkeln neben Saponin (Merck) und Tct. Quillaiae, Tct. Pirmulae und Tct. Sarsaparillae aufgetragen.

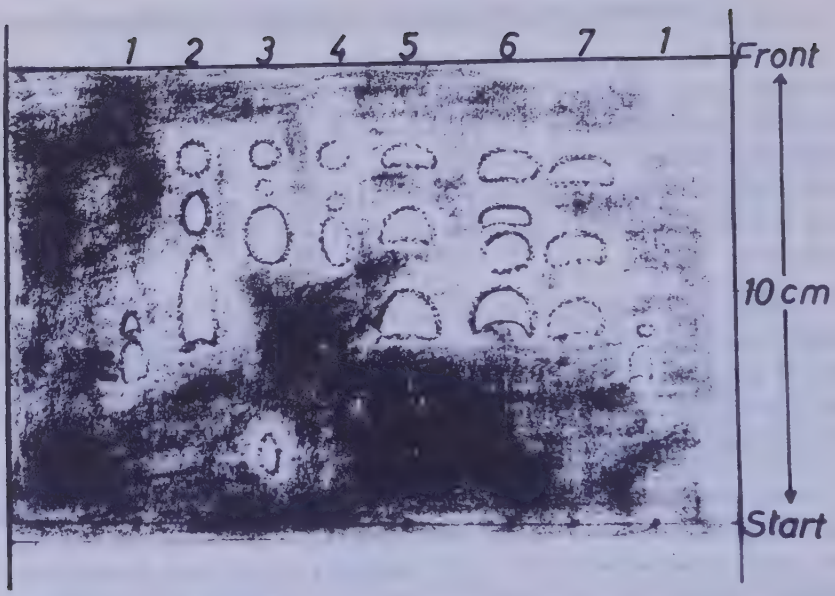


Abbildung 16. Blut-Gelatine-Platte verschiedener Saponine

1 Saponin "Merck" (50 µg)
2 Tinctura Quillaiae (10 µl)
3 Tinctura Primulae (10 µl)
4 Tinctura Sarsaparillae (10 µl)
5 Crocus speciosus (Knollen, 10 µl)
6 Crocus speciosus (Narbenschenkel, 10 µl)
7 Crocus speciosus (Staubgefäße, 10 µl)

Wie aus dem Chromatogramm (Abb. 16) ersichtlich ist, sind in den Extrakten von Knollen, Staubgefäßen drei, und in den Narbenschenkeln von C. speciosus 4 verschiedene, hämolysierende Substanzen enthalten. Die hRf-Werte liegen bei 47, 65, 68 und 80. Zum Vergleich wurden auch Pflanzenorgane anderer Crocus-Sorten untersucht; diese Ergebnisse sind in Tabelle 16 (S. 77) zusammengefaßt.

Tabelle 16. Intensität des Nachweises hämolysierender Substanzen verschiedener Pflanzenorgane bei bestimmten hRf-Werten

Sorte	Pflanzenorgan	Beim hRf-Wert 47	65	68	80 gefunden
C.aureus	Narbenschenkel	+++	++	-	(+)
	Staubgefäße	++	++	-	(+)
	Knollen	++	+	-	+
C.biflorus	Narbenschenkel	+++	+	-	-
	Staubgefäße	++	(+)	-	+
	Knollen	++	(+)	-	+
C.zonatus	Narbenschenkel	+++	+	(+)	+
	Staubgefäße	++	+	-	+
	Knollen	++	+	-	+
C.ancyrensis	Narbenschenkel	++	+	-	+
	Staubgefäße	++	+	-	+
	Knollen	++	(+)	-	+
C.pulchellus	Narbenschenkel	++	+	-	(+)
	Staubgefäße	++	(+)	-	-
	Knollen	+	(+)	-	-
C.speciosus	Narbenschenkel	+++	++	+	++
	Staubgefäße	+++	++	-	++
	Knollen	+++	++	-	++
C.sieberi	Narbenschenkel	++	+	-	+
	Staubgefäße	++	+	-	+
	Knollen	++	+	-	(+)
C.imperati	Narbenschenkel	+++	(+)	-	+
	Staubgefäße	++	+	-	+
	Knollen	++	+	-	(+)
C.versicolor pictoratus	Narbenschenkel	++	+	-	+
	Staubgefäße	++	+	-	+
	Knollen	++	+	-	(+)
C.sativus L. "La Gineta"	Narbenschenkel	-	-	-	-
	Staubgefäße	(+)	-	-	-
	Knollen	+	-	-	(+)
C."Große Gelbe"	Narbenschenkel	+++	+	-	+
	Staubgefäße	++	+	-	(+)
	Knollen	++	++	-	-
C."Kleine Gelbe"	Narbenschenkel	++	+	-	(+)
	Staubgefäße	+	+		(+)
	Knollen	+	+		(+)
C."Jeanne d'Arc"	Narbenschenkel	++	(+)	-	(+)
	Staubgefäße	+	+		(+)
	Knollen	+	+	-	-
C."Violet Vanguard"	Narbenschenkel	++	+	-	+
	Staubgefäße	+	+	-	-
	Knollen	+	+	-	+

Es bedeuten: - = kein hämolytischer Hof; (+) = schwacher hämolyt. Hof; + = sichtbarer hämolyt.Hof; ++ = gut sichtbarer hämolyt.Hof; +++ = sehr gut sichtbarer hämolyt.Hof.

Vergleicht man die Angaben der Spalten 3-6 in Tab.16, so findet man die hämolytische Substanz mit dem hRf-Wert 47 in wechselnden Konzentrationen bei allen untersuchten Sorten bzw. in allen Pflanzenorganen; lediglich C. sativus L. "La Gineta" macht hier eine Ausnahme. Die hämolytische Substanz mit dem hRf-Wert 65 erscheint ebenso in fast allen untersuchten Extrakten, während diejenige mit hRf = 68 nur bei C.zonatus wahrscheinlich ist. Häufiger dagegen wird die hämolytische Substanz mit hRf = 80, jedoch in geringerer Konzentration gefunden.

Bei den hämolytischen Substanzen, die in den untersuchten Crocus-Sorten aufgefunden wurden, handelt es sich möglicherweise um solche vom Steroid- und Triterpen-Typus, da sie im Chromatogramm in Nähe bekannter Saponine (Primulasäure A, Sarsasaponin und Quillaiasaponin) liegen. Versuche, sie mit einer Cholesterin-Schranke auf der Platte mittels eines kleinen, mit Cholesterin getränkten Filterpapierstreifchens, welches in Laufrichtung plaziert war, von den anderen Substanzen des Methanolextraktes schon auf der Platte abzutrennen, mißlangen.

Diese Versuche zeigten, daß der größte Anteil an hämolytischen Substanzen in den Narbenschenkeln gefunden wird. Hier konnte auch im Verhältnis zu anderen untersuchten Pflanzenorganen der größte Anteil an Farbstoff (Crocin) nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang mit den Befunden ZIMMERMANNs [83] ist wahrscheinlich.

XIII. Weitere Untersuchungen auf Alkaloide in C. sativus L.

Die Blütenblätter des Safrancrocus fallen bei der Ernte in großen Mengen an, und es erhebt sich die Frage nach einer Verwendung.

> Sie sind von violetter bis dunkelvioletter Farbe, die auf den Anthocyanfarbstoff Malvidin zurückzuführen ist, wie Untersuchungen von MAROTO [42] zeigten; diese Befunde konnten durch eigene Untersuchungen dc bestätigt werden.

In Blütenblättern wie auch in anderen Pflanzenorganen sollte festgestellt werden, ob Alkaloide darin vorkommen.

STAHL und COOPER [11] hatten bei einem ähnlichen Problem, dem Nachweis von Alkaloiden in Pfingstrosen-Wurzeln, ein Arbeitsschema angewendet, das zu diesen Untersuchungen übernommen werden konnte:

1) Saure Extraktion des Methanolextraktes,
2) Extraktion nach dem Alkalisieren der Droge,
3) Reineckat-Fällung des gereinigten wäßr.Extraktes,
4) Wasserdampfdestillation der alkalisierten Droge.

Zur Untersuchung gelangten schonend getrocknete sowie mit Ammoniumsulfat konservierte Blütenblätter. Daneben wurden jeweils 10 g frische Narbenschenkel, Staubgefäße und Knollen auf die gleiche Art untersucht. Nach Extraktion, Fällung und Einengen ergaben sich jedoch keine Anhaltspunkte, die auf das Vorkommen von quartären Alkaloiden, tertiären Aminen oder Wasserdampfflüchtigen Alkaloiden schließen lassen.

C. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Einleitend sind die systematische Stellung sowie die Polyploidie-Verhältnisse des Safrancrocus und der anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten 15 Crocus-Sorten zusammengestellt. Auch die Verfälschung des Safrancrocus sowie die medizinische Verwendung im Altertum bis zur Gegenwart wird zusammenfassend behandelt.

Weiterhin wird auf die Inhaltsstoffe der als Droge verwendeten Narbenschenkel von Safracrocus näher eingegangen; insbesondere auf das wasserlösliche Carotinoidglykosid Crocin, das den Wert und die Verwendung der Droge bestimmt.- Des weiteren interessiert das farblose, bitter schmeckende Glykosid Picrocrocin. Nach KUHN sollen bekanntlich beide Glykoside aus einer gemeinsamen Vorstufe, die er Protocrocin nannte, hervorgehen. Das Protocrocin ist bislang eine hypothetische Verbindung geblieben und es erschien sinnvoll, die Suche danach an frischem Pflanzenmaterial zu beginnen.

Zum Studium der genuinen Inhaltsstoffe sowie der Trocknungsverhältnisse wurde eine Expedition in eines der Hauptanbaugebiete des Safrancrocus, nämlich nach Zentralspanien (Mancha), im November 1964 vorgenommen. Es konnten wertvolle Angaben über die derzeitigen Anbaumethoden, die Drogenqualitäten und die Exportmenge in die verschiedenen Länder erhalten werden. Temperaturmessungen beim Trocknungsvorgang der frischen Narben ergaben, daß es sich hier um einen recht schonenden, bei 40 - 45° während 30 Minuten ablaufenden Prozeß handelt. Die frisch getrocknete Droge ist wie die frische Droge völlig geruchlos. Die Chromatographie an Ort und Stelle ergab Hinweise auf die Crocin- und Picrocrocin-Zusammensetzung. Allerdings wurden auch keinerlei Hinweise auf einen gelben Stoff erhalten, wie es das Protocrocin sein müßte. Auch Safranal oder ähnliche Geruchsstoffe, wie sie in der Handelsdroge vorkommen, sind in der frischen Droge nicht enthalten. Die typischen Geruchsstoffe entwickeln sich

erst bei der Lagerung der Droge in nicht zu trockener Luftatmosphäre.

Daran schlossen sich Untersuchungen über die bei der Wasserdampfdestillation erhaltenen Produkte an. Es ergab sich, daß das sogenannte ätherische Öl vorwiegend aus ß-Hydroxycyclocitral, aber nicht aus Safranal besteht. Erst wenn man die Droge im sauren oder alkalischen Milieu der Wasserdampfdestillation unterzieht, erhält man ein ätherisches Öl, dessen Hauptkomponente Safranal ist. Die Entstehung der beiden Produkte aus Picrocrocin wird diskutiert und gezeigt, daß auch mit dem TAS-Verfahren eine Thermomikro-Spaltung zum Safranal mit anschließender Direktauftragung gelingt.

Als Voraussetzung für die Erkennung verschiedenartiger "Crocine" einschließlich des Protocrocins sowie des Picrocrocins und der einzelnen Zucker waren zuvor entsprechende dc Methoden ausgearbeitet worden. Damit gelang dann auch die Untersuchung der Narbenschenkel der eingangs genannten Crocus-Sorten.

Besonders auffallend war der Befund, daß in einer ganzen Reihe von Crocus-Narbenschenkeln neben dem klassischen Crocin zwei weitere, wasserlösliche gelbe Carotinfarbstoffe enthalten sind; diese wurden zunächst als Crocin X und Crocin Y bezeichnet.

Die Alkali- wie auch die enzymatische Spaltung ergaben, daß es sich bei dem chromophoren Rest um das all-trans-Crocetin handelt. Die Unterschiede liegen also in den Zucker-Resten. Das klassische Crocin ist bekanntlich der Di-Gentiobioseester des Crocetins. Die gezielten fermentativen Spaltversuche mit anschließender Chromatographie der Zucker ergaben, daß im Crocin X je 1 Molekül Gentianose und 1 Molekül Gentiobiose enthalten sind. Im Crocin Y liegen 2 Moleküle Gentianose vor.

Im weiteren wurden nun die Crocin- und Picrocrocin-Zusammensetzung quantitativ untersucht. Hierbei wurde insbesondere auf das molare Verhältnis von Crocin zu Picrocrocin geachtet. Nach KUHN soll das hypothetische Protocrocin in 1 Mol. Crocin und 2 Moll. Picrocrocin zerfallen. Es wurden bei der quantitativen

Bestimmung dieser beiden Substanzen direkt auf dem Chromatogramm Molverhältnisse von 1:1.3 wie auch solche von 1:2.7 gefunden; letzteres ist ein weiterer Beweis, daß die Protocrocin-Hypothese nicht mehr haltbar ist.

Von praktischem Interesse sind nun die verschieden hohen Crocin-Gehalte des Safrancrocus (1.9 - 15%), in dem übrigens nur das klassische Crocin vorkommt, nicht aber die neu aufgefundenen Gentianoside. Die Picrocrocin-Werte liegen zwischen 2.7 bis 12.9%.

Abschließend wurden orientierende Untersuchungen weiterer, sekundärer Pflanzen-Inhaltsstoffe durchgeführt. Es zeigte sich, daß in den verschiedenen Organen des Safrancrocus keine Alkaloide oder ähnlich reagierende Verbindungen vorkommen. Dagegen konnten 4 verschiedene, hämolysierende Substanzen nachgewiesen werden, die in unterschiedlichen Mengen vorkommen. Es handelt sich dabei möglicherweise um Triterpensaponine.

D. Experimenteller Teil

Trocknung und Aufbewahrung der Narbenschenkel

1) Gefriertrocknung

Die frisch geernteten Narbenschenkel heimischer Crocus-Sorten werden unter vermindertem Druck (8 - 10 Torr) in einer Gefriertrockenanlage der Fa.Leybold getrocknet. Durch den Kühleinsatz fließt vergällter Alkohol, dessen Temperatur von einem Lauda-Kryomat konstant auf -30° gehalten wird.

2) Lagerung der gefriergetrockneten Droge

Die lyophilisierten Narbenschenkel werden in gut verschlossene Glasgefäße gegeben und unter Lichtausschluß aufbewahrt.

3) Konservierung der frischen Narbenschenkel

Zur Inaktivierung pflanzlicher Enzyme wird 1 Tl. frische Narbenschenkel in 5 Tle. Methanol (p.a.) eingelegt.

Gewinnung des ätherischen Öls

1) In neutralem Milieu

Die Destillation erfolgte in einer Karlsruher Apparatur. 100 g trockne und zerstoßene Droge werden mit 1 ltr. Wasser in einem 2-Liter-Rundkolben mittels Heizpilz bei Stufe II erhitzt. Die Destillationsgeschwindigkeit ist so bemessen, daß pro Minute 3 ml Destillat übergehen. Als Vorlage diente ein Gemisch aus Äther-Pentan (1 + 1).

2) In saurem Milieu

Nach der Destillation in neutralem Milieu wird zur Gewinnung des Safranals der Kolbeninhalt mit 10proz.Schwefelsäure (100 ml) angesäuert und erneut destilliert. Die Destillationsgeschwindigkeit beträgt 3 ml pro Minute; das Destillat wird in Pentan aufgefangen.

3) Aufstellen des Destillationsdiagramms

Während der Destillationen werden alle 30 Minuten die Öl-haltigen Pentan-Äther- bzw. Pentan-Schichten in kleine

Auffangkölbchen wasserfrei abgelassen. Das Entfernen der Lösungsmittel erfolgt bis zur Gewichtskonstanz auf einer Heizbank (nach Prof. Policord) bei Heizstufe III (ca. 40°). Nach anderthalb bzw. 2stündiger Destillationsdauer ging kein ätherisches Öl mehr über. Die erhaltenen Mengen werden in ein Gewicht-Zeit-Diagramm eingetragen.

Extraktion der Droge

Von den 12 Stdn. über wasserfreiem Calciumchlorid getrockneten Narbenschenkeln werden 100 g in einem Porzellanmörser grob gepulvert, mit gereinigtem Seesand im Verhältnis 1:1 gemischt und in eine Säule von 6 cm Durchmesser gefüllt (zwischen Hahn und Droge befindet sich Glaswolle) und nacheinander mit folgenden Lösungsmitteln extrahiert:

1 ltr. Pentan
4 ltr. Petroläther (40 - 60°)
3 ltr. Dichlormethan
5 ltr. Äther (wasserfrei)
3 ltr. Methanol (p.a.)

Die Abtropfgeschwindigkeit wird so eingestellt, daß pro Minute 1 - 1.5 ml Extrakt erhalten werden, der schonend im Rotationsverdampfer eingeengt wird.

Chromatographische Methoden

1) Dünnschicht-Chromatographie

a) Geräte: Zur Bereitung der Platten werden die Grundausrüstung Bestell-Nr. 120100 und die DC-Grundausrüstung Minor, Bestell-Nr. 120300 der Fa.Desaga, Heidelberg, benutzt. Für analytische Trennungen werden Platten der Größe 20 x 20 cm bzw. 10 x 15 cm, zur präparativen DC solche der Größe 20 x 40 cm beschichtet.

b) Sorptionsmittel: Die Schichten werden mit Kieselgel HF_{254} nach STAHL, Kieselgel G und Kieselgur G für die DC nach STAHL der Fa.Merck sowie Cellulosepulver der Fa. Macherey, Nagel Co. bereitet.

c) Herstellung der Schichten: Die Vorbereitung der Schichten erfolgt nach der Standard-Methode. Platten, die zu analytischen Trennungen verwendet werden, sind nach dem Ausstreichen 0.25 mm und die für präparative Zwecke bei Verwendung von Kieselgel HF_{254} 0.5 mm dick. Cellulose-Schichten haben naß eine Dicke von 1 mm.

Kieselgel-HF_{254}-Schichten: 25 g Kieselgel HF_{254} werden mit 50 ml dest.Wasser angeteigt.

Kiesel-G-Schichten (mit 2n Weinsäure imprägniert): 25 g Kieselgel G werden mit 50 ml 2n wäßr.Weinsäure angerührt.

Kieselgur-G-Schichten (mit 0.02m wäßr.Natriumacetat imprägniert): 25 g Kieselgur G werden mit 50 ml 0.02m wäßr. Na-acetat angeteigt.

Kieselgel-G-Kieselgur-G-Mischschichten (mit 0.02m wäßr. Na-acetat imprägniert): 25 g Kieselgel G und 20 g Kieselgur G werden gemischt und mit 50 ml 0.02m wäßr. Na-acetat angeteigt.

Auftragen der Vergleichslösungen

a) Von Zuckern: Von den aufgetragenen Zuckern werden bei Verwendung von Kieselgur G 1 µg und bei Kieselgel-G-Kieselgur-G-Mischschichten 2 µg aufgetragen. Die Zucker werden in Methanol (p.a.) gelöst.

b) Von Crocin, Picrocrocin und ß-Hydroxycyclocitral: Von Crocin werden 3 µg und von Picrocrocin sowie von ß-Hydroxycyclocitral wird 1 µg aufgetragen. Die Substanzen sind in Methanol gelöst.

c) Von Safranal: 1 µg einer Safranal-Pentan-Lösung wird aufgetragen.

d) Von Crocetin: 5 µg einer Crocetin-Pyridin-Lösung werden aufgetragen.

Auftragen der Pflanzenextrakte und Entwickeln:

Von den Extrakten werden mit einer Blutzucker-Pipette 10 µl (wenn nicht anders angegeben) im Abstand von 15 mm vom unteren Plattenrand aufgetragen. Es wird 10 bzw. 15 cm aufsteigend bei Kammersättigung entwickelt.

Fließmittel

Es werden ausschließlich Fließmittel zur Chromatographie (zur Analyse) der Fa.Merck verwendet.

Sichtbarmachung

Die Chromatogramme werden sofort nach dem Entwickeln und Abdampfen des Fließmittels im kurzwelligen UV-Licht bei λ = 254 nm betrachtet; die in diesem Bereich absorbierenden farblosen Substanzen können erkannt werden.

Sprühreagentien

Die unter 1) - 3) aufgeführten Reagentien sind bei E.STAHL, Dünnschicht-Chromatographie, ein Laboratoriumshandbuch, 2.Aufl., Springer-Verlag, Berlin 1967, unter den Nr. 14, 19 und 76 B auf den Seiten 816, 817 und 827 zu finden.

1) Anilinphthalat-Reagens (Nr. 14).

2) Antimon(III)-chlorid-Reagens (Carr-Price-Reagens, Nr.19).

3) 2.4-Dinitro-phenylhydrazin-Lösung (Nr.76 B).

4) Anthron-Reagens: Zu 100 ml konz.Schwefelsäure (d = 1.716, p.a.) der Fa.Merck werden 200 mg Anthron (p.a.) gegeben.

5) Bortrifluorid-Reagens: 3 ml Bortrifluorid-Lösung (Merck) werden mit 3 ml Chloroform versetzt und aufgesprüht.

6) GOD-Reagens:

Lösung A: 5 g o-Toluidiniumchlorid (p.a., Merck) werden in 100 ml des.Wasser gelöst. Zu 5 ml der Farbstoff-Lösung werden 10 mg Glucoseoxidase, 20 U/mg (Fa.Boehringer, Mannheim) gegeben.

Lösung B: 10 mg Peroxidase (spez.Aktivität ca. 36 U/mg) der Fa. Boehringer, Mannheim, werden in 50 ml dest.Wasser gelöst.

Sprühlösung: Auf eine Platte 20 x 20 cm werden zuerst 5 ml der Lösung A und sofort anschließend 5 ml der Lösung B aufgesprüht.

7) Dragendorffs Reagens (modifiziert nach Munier und Macheboeuf):

Lösung A: 0.85 g basisches Wismutnitrat werden mit 10 ml Eisessig und 40 ml dest.Wasser versetzt.

Lösung B: 8 g Kaliumjodid werden in 20 ml dest.Wasser gelöst.

Sprühlösung: 1 ml Lösung A + 1 ml Lösung B werden mit 4 ml Eisessig und 14 ml dest.Wasser gemischt.

8) Silbernitrat-Reagens nach Dedonder: Zu 20 ml Aceton wird unter Rühren 1 ml gesätt. $AgNO_3$-Lösung gegeben; danach wird so viel Wasser tropfenweise zugesetzt, bis ausgefallenes $AgNO_3$ wieder in Lösung gegangen ist. Nachbehandlung: Die besprühten feuchten Platten werden 15 - 20 Minuten unter Lichtausschluß in eine mit Ammoniak-Gas gesättigte Kammer gestellt. Anschließend wird im Trockenschrank bei 80° erwärmt.

Aufdampfen mit dem TAS-Ofen

Gerät: Prototyp des TAS-Ofens.

Picrocrocin, trans-Crocetindimethylester sowie mit Diazomethan behandeltes Drogenpulver werden bei 200° aufgedampft. In der Glaspatrone befindet sich zwischen Untersuchungsmaterial und Kapillare etwas Glaswolle. Es werden jeweils 20 mg einer Picrocrocin-Stärke-Verreibung (1:100) sowie eine gleichstarke Verreibung des Esters mit Stärke in die Patrone eingefüllt. Für diese Aufdampfversuche genügte der Wassergehalt der Stärke. 20 mg Drogenpulver werden mit 50 mg inaktiviertem Blaugel (als Treibmittel) eingesetzt. Die gefüllte Patrone wird mit einem HD-Clip fest verschlossen. Vor Beginn des Aufdampfens wird die Dünnschicht-platte in die Führungsschiene des Gerätes geschoben. Mit Hilfe des Spindeltriebes wird der Abstand zwischen

Kapillare und Schicht auf ca. 1 mm eingestellt. Die Aufgabebedingungen für Picrocrocin-Stärke (1:100), trans-Dimethylcrocetinester-Stärke (1:100) und das vorbehandelte Drogenpulver waren:

TAS: 1) 20 mg, 200°, 30 Sekunden
2) 20 mg, 200°, 60 Sekunden.

Nachweis der Saponine auf dem Dünnschicht-Chromatogramm

a) Bereitung der Blut-Gelatine: Die Bereitung der Blut-Gelatine sowie das Aufgießen auf das Chromatogramm ist bei E.STAHL, Dünnschicht-Chromatographie, ein Laboratoriumshandbuch, 2.Aufl., Springer-Verlag, Berlin 1967, S. 242, genauestens beschrieben.

b) Erkennung hämolysierender Substanzen: An Stellen, wo sich hämolysierende Substanzen befinden, bilden sich im Laufe einer Stunde sog. hämolytische Höfe, die lackfarben sind und sich von der übrigen deckfarbenen Schicht deutlich abheben.

Säulenchromatographie

1) Vom Picrocrocin

a) Reinigung und Aktivierung des Sorptionsmittels: 12 g Polyamidpulver (feinst, Farbwerke Hoechst) werden mit Chloroform (p.a.) in eine Säule (2 x 30 cm) eingeschlämmt und so lange mit demselben Lösungsmittel gewaschen, bis Eindampfproben des Chloroforms rückstandsfrei waren. Anschließend wird das Sorptionsmittel mit 30 ml NH_3-haltigem Methanol gewaschen. Danach wird die Säule entleert und das Polyamidpulver 48 Stdn. im Trockenschrank bei 60° aktiviert; dann wird es mit 20 ml Methanol (p.a.) vermischt und in die Säule eingeschlämmt.

b) Chromatographie: 0.2 g des Picrocrocin-haltigen Rohextraktes werden in 3 ml Methanol gelöst und auf die Säule gegeben. Dann wird 5mal mit je 10 ml Methanol, Methanol-Wasser (95 + 5) und Methanol-Wasser (90 + 10) fraktioniert eluiert. Nach schonendem Entfernen des Lösungsmittels i.Vak. (Rotationsverdampfer) werden aus den letzten Fraktionen des Eluats gelbliche Kristalle erhalten. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Äthanol-Chloroform (1 + 2) lag der Fp. bei 154°.

2) Reinigung von präparativ gewonnenem Crocetin

Zur Reinigung des Crocetins dient als stationäre Phase inaktives Kieselgel (0.05 - 0.2 mm, zur Chromatographie) der Fa.Merck. 15 g Kieselgel werden mit Benzol (p.a.) in eine Säule 2 x 20 cm eingeschlämmt, die so mit Aluminiumfolie umkleidet ist, daß nur eine schmale Nahtstelle freibleibt, an der die Trennung verfolgt werden kann. Zuerst wird 5mal mit 10 ml Benzol (p.a.), dann 5mal mit 10 ml Benzol-Chloroform (90 + 10) eluiert und in Fraktionen aufgetrennt. Aus 100 mg Roh-Crocetin konnten so 65 mg reines Crocetin gewonnen werden. Nach Umkristallisieren aus Pyridin wurden Kristalle vom Fp. 258° erhalten.

Entfernen des Pyridins von Cellulose-Schichten

Vor dem Ausschaben der dc getrennten gelben Substanzen von der Platte muß das Pyridin, das vom Fließmittel stammt, schnell und schonend entfernt werden. Dazu wird die Platte sofort nach dem Chromatographieren in einem genügend großen Exsikkator über konz.Schwefelsäure bei 12 Torr innerhalb 1 Stde. Pyridin-frei gemacht.

Elution der Crocine aus der Cellulose

Die ausgeschabten gelben Zonen werden in kleine Säulen (15 x 200 mm) gegeben, die an ihrem unteren Ende mit Glaswolle gefüllt sind. Eluiert wird mit Dioxan-Wasser (90 + 10).

Spaltung der Crocine

Nach Entfernen des Dioxan-Wasser-Gemisches im Rotationsverdampfer wird der Rückstand in 1 ml Methanol aufgenommen, mit 2 Tropfen 1proz. Kalilauge versetzt und 1 Stde. unter Stickstoff dunkel aufbewahrt. Anschließend wird die Lösung mit 30proz. Essigsäure auf pH 3 gebracht und eine weitere Stunde unter N_2 dunkel aufbewahrt.

Isolierung der Spaltprodukte

1) Crocetin

Die voranstehende, angesäuerte Lösung (Farbstoff + Zuckeranteile) wird mit 1proz. Kalilauge neutralisiert und sofort

fünfmal mit 3 ml Chloroform (p.a.) ausgeschüttelt. Die vereinigten gelben Chloroform-Phasen, die das Crocetin enthalten, werden über geglühtem Natriumsulfat getrocknet.

2) Zucker

Die zuckerhaltige Restlösung (wäßr. Phase des voranstehenden Ansatzes) wird zur Abtrennung von anorganischen Bestandteilen mit dest.Wasser auf 5 ml aufgefüllt und über einer Säule von 3 g Mischbettaustauscher V der Fa.Merck gereinigt. Anschließend wird 5mal mit 3 ml dest.Wasser eluiert. Die gesammelten Eluate werden im Rotationsverdampfer schonend zur Trockne eingeengt und die Zucker in 1 ml Methanol (p.a.) aufgenommen.

Enzymatische Methoden

1) Vorbereitung der Enzymlösung

Zu Vorversuchen wurden eingesetzt:

1) α-Amylase (20 E/mg nach Wohlgemuth)der Fa.Roth,Karlsruhe
2) ß-Amylase (20 E/mg nach Lintner) der Fa.Roth,Karlsruhe
3) ß-Glucosidase (20 E/mg) der Fa.Boehringer, Mannheim
4) Esterase P (12 E/mg) der Fa.Merck, Darmstadt
5) Acetylcholinesterase aus Rindererythrocyten (ohne Angabe) der Fa.Serva, Heidelberg
6) Invertase (20 E/g nach Weidenhagen) der Fa.Merck
7) Hydrolasengemisch aus Aspergillus oryzae (keine Angabe) der Fa.Boehringer, Mannheim

Es wurden jeweils 5 mg der Enzyme 1) - 5) und 7) in 1 ml Wasser oder Phosphatpuffer (nach Sörensen, pH 7.2) gelöst bzw. suspendiert. Von diesen Lösungen (Suspensionen) wurden 0.1 ml eingesetzt.Von 6) wurden nur 2.5 mg entspr. der stärkeren Aktivität in 1 ml Puffer gelöst.

2) Vorbereitung der Substratlösung

a) Zur Spaltung des klassischen Crocins

30 mg Crocin werden in 5 ml dest.Wasser gelöst; davon werden 0.5 ml, entsprechend 3 mg Crocin, zu 1.4 ml Phosphatpuffer (pH 7.2, voranstehend) in einen 5-ml-Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen gegeben und in einem Wasserbad (30°) mit

o.1 ml Esterase-Suspension inkubiert.

b) Zur Spaltung der Crocine X und Y

Von den wäßrigen gelben Lösungen der Crocine werden je 2 ml entnommen und mit 1 ml Phosphatpuffer (pH 7.2) in 5-ml-Erlenmeyerkolben gegeben, und anschließend wird der Nullwert dc bestimmt.

3) Inkubieren der Substratlösung

Zur Inkubation wird Esterase verwendet, da sie sich in Vorversuchen als besonders günstig erwiesen hatte; bereits 0.8 Einheiten reichten zur Spaltung bei 2a). Trotzdem wird jeder Ansatz mit einer überschüssigen Menge Enzym (ca. 10 E) versetzt. Die inkubierten Substrate werden in ein Wasserbad von 30° gegeben und für die Dauer der Spaltung in leichter Schüttelbewegung gehalten.

4) Entnahme der Proben

Die Entnahme von Proben der inkubierten Substrate erfolgt stündlich. Es werden jeweils 10 µl entnommen, sofort aufgetragen und chromatographiert.

5) Zur Spaltung der Zucker

Aus der wäßrigen Phase von 4) werden Reste des organischen Lösungsmittels (Dichlormethan), das zur Abtrennung des Aglykons verwendet wurde, sowie nicht-umgesetzte Esterase durch 10 Min. langes Erhitzen im Wasserbad entfernt bzw. ausgefällt. Dann wird zur Trockne eingeengt, der Rückstand in 3 ml dest.Wasser aufgenommen, mit 1 ml Pufferlösung versetzt und mit den auf voranstehender Seite genannten Enzymen 3), 4), 6) und 7) unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Ergebnisse der dc Kontrolle sind in Tabelle 13 (S. 66) enthalten.

Physikalische Bestimmungen

1) Schmelzpunkte

Die Substanzen werden vor der Bestimmung 12 Stdn. im Exsikkator über Blaugel getrocknet und anschließend ihre Schmelzpunkte mit dem Leitz-Schmelzpunktsmikroskop bestimmt.

2) Aufnahme der IR-Spektren

Von den Verbindungen werden KBr-Preßlinge hergestellt und diese (oder als Film) im Doppelstrahl-Spektrophotometer IR-4 der Fa.Beckman im Spektralbereich 15 - 2 µm bei einer Spaltbreite von 0.06 mm und λ = 3.5 nm gemessen. Als Lichtquelle diente ein Nernst-Stift mit einer Stromstärke von 0.6 Amp.; das Bezugsmedium war Luft.

3) Aufnahme der Absorptionsspektren im UV- und sichtbaren Bereich

Die qualitativen Absorptionsspektren werden im Spektralphotometer PM Q II der Fa.Zeiss aufgenommen. Die Substanzen werden in den entsprechenden Lösungsmitteln (p.a.) gelöst und in Quarzküvetten von 1.001 cm Schichtdicke gegeben. Die Spaltbreite beträgt 0.02 mm. Als Lichtquelle dienen eine Wasserstofflampe H_{30} und eine Wolfram-Lampe.

4) Aufnahme der Remissionsspektren

Gerät: Prototyp des Chromatogramm-Spektralphotometers der Fa. Zeiss.

a) Von Picrocrocin

Alle Untersuchungen werden mit der gleichen Geräteanordnung durchgeführt:

Geräteanordnung: Pr-M; Irisblendendurchmesser 2 cm, Linsenstellung 25 x 0, Spaltbreite 1 mm, Verstärkung des Photostromes: 7/1/I, Lichtquelle: H_{30}-Lampe; λ = 250 nm.

b) Von Crocin

Alle Untersuchungen wurden mit folgender Geräteanordnung durchgeführt.

Geräteanordnung: M-Pr; Irisblendendurchmesser 2cm, Linsenstellung 0 x 25, Spaltbreite 0.1 mm, Verstärkung des Photostromes: 4/10/I, Lichtquelle: Glühlampe; λ = 453 nm.

E. Literaturverzeichnis

[1] ASCHOFF 1818.

[2] BAILEY, L.H.: Manual of Cultivated Plants, S.264, The MacMillan Comp., New York 1949.

[3] BAYTOP, T.: Pharmac. Acta Helvetiae 25, 337 (1950).

[4] BOLLIGER, H.R., zit. bei STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie, ein Laboratoriumshandbuch, 1.Aufl., Springer-Verlag, Berlin 1962, dort S.217.

[5] BOLLIGER, H.R. und A.KÖNIG, in STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie, ein Laboratoriumshandbuch, 2.Aufl., Springer-Verlag, Berlin 1967, dort S.257 f.

[6] BRAUN, H.: Pharmakologie des Deutschen Arzneibuches, 6. Ausgabe, und des Ergänzungsbuches 6, 3.Aufl., Wiss. Verlagsges., Stuttgart 1949, S.220.

[7] BRAUN, H.: vgl. Lit.[6], dort S.220.

[8] BROCKMANN, H.: Angew.Chem. 53, 384 (1940).

[9] Fa.CAESAR u. LORETZ, Hilden: Marktbericht über Drogen; Dtsch. Apotheker-Ztg. 36, XXX (1968).

[10] CHOPRA, R.N.: Indian Indigenous Drugs, S.324, The Art Press, Calcutta 1933.

[11] COOPER, S.F. und E.STAHL: Dissertation S.F.COOPER, Univ. Saarbrücken 1967.

[12] DECKER,F.: Chemiker-Ztg. 30, 18, 705 (1906).

[13] DIOSCORIDES, I.: De materia medica (engl. von GUNTHER, R.T.: The Greek Herbal of DIOSCORIDES, Univ.Press, Oxford 1934.

[14] ESCOFFIER, A.: La Guide Culinaire, 7.Aufl., Deutsche Ausgabe, S.240, Gießen 1964.

[15] FILHOL: C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 50, 1182 (1860).

[16] FLÜCKIGER, F.A.: Pharmakognosie des Pflanzenreiches, 2.Aufl., R.Gaertners Verlagsbuchhadlg., Berlin 1883.

[17] FRANK, A.: Dtsch.med.Wschr. 86, 1618 (1961).

[18] GILLAM, A.E. und M.S.EL HIDI: Nature [London] 136, 914 (1935); GILLAM, A.E. und B.J.SENIOR: Biochem.J. 30, 1249 (1936); 31, 251 (1937).

[19] GOODWIN, T.W.: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, S. 143, Academic Press, London 1965.

[20] Hatmann, M., FÖRSTER, H. und L.WIESE: Naturwissenschaften 43, 313 (1956).

[21] HAUSCHILD, F. und V.GÖRISCH: Einführung in die Pharmakologie und Arzneiverordnungslehre, S.159, VEB Thieme, Leipzig 1967.

[22] HERZIG, J. und F.FALTIS: Liebigs Ann.Chem. 431, 40 (1923).

[23] HILL, E.G. und A.P.SIRKAR: J.chem.Soc.[London] 1907, 1501.

[24] HUTCHINSON, J.: The Families of Flowering Plants, Bd.II, Monocotyledones, 2.Aufl., The Clarendon Press, Oxford 1959, S.648.

[25] INHOFFEN, H.H., ISLER, O., VON DER BEY,G., RASPÉ,G., ZELLER,P. und R.AHRENS: Liebigs Ann.Chem. 580, 7 (1953).

[26] JACOBS, W.A. und A.HOFFMANN: J.biol.Chemistry 69, 153 (1926); 79, 519 (1928).

[27] JORK, H.: Cosmo Pharma 1/67, 1 (1967); III.Internat. Chromatographie-Symposium, Brüssel, 14.Sept. 1964; J.Pharmac Belgique 1966, 295.

[28] JORK,H.: Habilitationsschrift, in Vorbereitung.

[29] KARASAWA, K.: Jap.J.Bot. 11, 129 (1940/41); 12, 475 (1943); Jap. J. Gen. 9, 6 (1933); 20, 128 (1944).

[30] KARRER, P. und H.SALOMON: Helv.chim.Acta 10, 397 (1927); 11, 513 (1928); KARRER,P. und K.MIKI: Helv.chim.Acta 12, 985 (1929).

[31] KAYSER, R.: Ber.dtsch.chem.Ges. 17, 2228 (1884).

[32] KRUKENBERG, F.W.: Vergleichende physiologische Studien, Ser. 1-2, Heidelberg 1880/1882.

[33] KUHN, R. und I.LÖW: Ber.dtsch.chem.Ges. 74, 219 (1941).

[34] KUHN, R. und I.LÖW: Kolloid-Z. 100, 136 (1942).

[35] KUHN,R. und F.MOEWUS: Ber.dtsch.chem.Ges. 73,547 (1940).

[36] KUHN, R. und F.L'ORSA: Ber.dtsch.chem.Ges. 64, 1732 (1931); KUHN,R. und A.WINTERSTEIN,ebenda 66, 209 (1933); KUHN, R. und Y.WANG; ebenda 72, 871 (1939).

[37] KUHN,R. und A.WINTERSTEIN: Ber.dtsch.chem.Ges. 67, 344(1934

[38] KUHN,R. und A.WINTERSTEIN: Ber.dtsch.chem.Ges. 65, 1873 (1932); 66, 1733(1933).

[39] LEUTHARDT, F. und H.P.WOLF: Helv.chim.Acta 37, 1734(1954).

[40] LEWIN,L.: Lehrbuch der Toxikologie; Gifte und Vergiftungen, 4.Aufl., S.873, Verlag Stilke, Berlin 1929; Fruchtabtreibung durch Gifte und andere Mittel, Verlag Stilke, Berlin 1925.

[41] LIAAEN, S. und Sörensen,N.A.: Second Internat. Seaweed Symposium, S. 25, Pergamon Press, London 1956.
[42] MAROTO, A.L.: Rev. Real Acad. Ci. exact., físic. natur. Madrid 44, 79 (1951).
[42a] MATHER, K.: J.Genetics 26, 129 (1932).
[43] MARTINSON, A.: J.Chromatogr. [Amsterdam] 24, 487 (1966).
[44] MAW,G.: Synopsis of the Genus Crocus, in Gardeners Chronicle [N.S.] 16, 367 (1881); The Genus Crocus, London 1886.
[45] MOTTIER,H.: Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. [Bern] 43, 118 (1952).
[46] OTTKE, R.C., TATUM, E.L., ZABIN,J. und K.BLOCH: J.biol. Chemistry 189, 429 (1951).
[47] Papyrus EBERS, zit. bei Lit.[69].
[48] PAULING,L.: Fortschr.Chem.org.Naturstoffe[Wien] 3,203(1939).
[49] PERKIN, A.G.: J.chem.Soc.[London] 1912, 1538.
[50] PERROT,K. und A.GORIS: Bull. Sci. pharmacol. 16, 198 (1909).
[51] RITTEL,W., DUNGER,A. und T.REICHSTEIN: Helv.chim.Acta 36, 434 (1953).
[52] ROCHLEDER,F. und L.MAYER: J.prakt.Chem.[1] 72, 394 (1857); [1] 74, 1 (1858).
[53] RUEGG,K.: Beiträge zur Geschichte der offizinellen Drogen, Dissertation Univ. Basel 1936.
[54] SCHINDLER,H.: Inhaltsstoffe und Prüfungsmethoden homöopathisch verwendeter Heilpflanzen, S.84, Editio Cantor, Aulendorf 1955.
[55] SCHMID,L. und E.KOTTER: Mh.Chem. 59, 341 (1932).
[56] SOERENS,A.: Neues Färberbuch, Kopenhagen 1771.
[57] STAHL,E.: J.Chromatogr.[Amsterdam] 37, 99 (1968); Vortrag Schweiz.Chem.Ges., Basel 1968.
[58] STAHL,E.: Arch.Pharmaz.,Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 292/64, 411 (1959).
[59] STAHL,E.: Proc.Soc.Anal. Chem. 1, 121 (1964); Z.analyt. Chem. 221, 3 (1966).
[60] STAHL,E., BOLLIGER, H.R. und L.LEHNERT: Dtsch.Ges.Ernährung 9, 129 (1963); STAHL,E.: Chemie-Ing.-Techn. 36, 941(1964).
[61] STAHL,E. und J.FUCHS: Dtsch.Apotheker-Ztg. 108, 1227 (1968).
[62] STAHL,E. und U.KALTENBACH: J.Chromatogr.[Amsterdam] 5, 351(1961).

[63] STAHL,E., in KARSTEN,WEBER,STAHL: Lehrbuch der Pharmakognosie für Hochschulen, 9.Aufl., S.239, Verlag G.Fischer, Stuttgart 1962.

[64] STAHL,E., SCHORN,P.J. und E.WEIGERT: unveröffentlicht.

[64a] STAHL,E. und WULFF,H.D.: Naturwissenschaften 47,114(1960).

[65] STOLL,A. und J.RENZ: Helv.chim.Acta 35, 1310 (1952).

[66] THEODOSSIOU,Ph.: Le Safran de Grèce, Dissertation Univ. Montpellier 1954.

[67] TSCHESCHE,R. und K.H.BRATHGE: Chem.Ber.85, 1042 (1952).

[68] TSCHESCHE,R., AXEN,U. und G.SNATZKE: Liebigs Ann.Chem. 669, 171 (1963).

[69] TSCHIRCH,A.: Handbuch der Pharmakognosie,II.Abt., S.1432, Verlag Tauchnitz, Leipzig 1917.

[70] TSWETT, M.: Ber.dtsch.bot.Ges. 29, 630 (1911).

[71] VILLAR PALASI: Farmacognosia [Madrid] 8, 305 (1948).

[72] WACKENRODER,K.: Geigers Mag. Pharmaz. 33, 144 (1831).

[73] WARREN,C.K. und B.C.L.WEEDON: J.chem.Soc.[London] 1958,3972.

[74] WEISS,B.: J.prakt.Chem.[1] 101, 65 (1867).

[75] WHITE,L.M. und G.E.SECOR: Science [Washington] 125, 495 (1957).

[76] WINTERSTEIN,E. und J.TELECZKY: Helv.chim.Acta 5, 376(1922).

[76a] WINTERSTEIN,E. und J.TELECZKY: Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 120, 141 (1922).

[77] WOLKINGER,F.: Dissertation Univ.Graz 1963.

[78] YAMAGUCHI,M.: Bull.chem.Soc.Japan 30, 111, 979 (1957); 31, 51, 739 (1958).

[79] ZECHMEISTER,L.: Cis-trans-Isomeric Carotenoids, Vitamins A and Arylpolyenes, S.19, Springer-Verlag, Wien 1962.

[80] ZECHMEISTER,L.: Chem.Reviews 34, 267 (1944).

[81] ZECHMEISTER,L. und L.CHOLNOKY: The Principles and Practice of Chromatography, S. 125 und S.295, Chapman and Hall, London 1950.

[82] Fa.ZEISS, Carl: Prospekt zum Chromatogramm-Spektralphotometer für die DC nach STAHL.

[83] ZIMMERMANN,J.: Helv.chim.Acta 19, 247 (1936); 21, 853(1938) 29, 1455 (1946).

Den Herren Dr.H.-G. Hahn und J.Müller vom Institut für Organische Chemie danke ich besonders für die sorgfältige Aufnahme der IR-Spektren.

Durch Bereitstellung des VW-Expeditionsbusses durch die STIFTUNG VOLKSWAGENWERK an Herrn Prof.Dr. E. Stahl wurde die Durchführung der Arbeit wesentlich unterstützt.

Lebenslauf

Am 28.Mai 1931 wurde ich als Sohn der Eheleute Karl Wagner und seiner Ehefrau Ida, geb.Siegel, in Saarbrücken geboren. Von Ostern 1937 bis Sommer 1941 besuchte ich die Volksschulen in Saarbrücken und Oberbieber/Rhein. Im Herbst 1941 trat ich in die Sexta der Oberrealschule Saarbrücken ein, die ich mit kriegsbedingten Unterbrechungen bis Sommer 1948 besuchte. Von 1948 bis 1951 absolvierte ich eine Praktikantenzeit im Baugeschäft meines Großvaters, bevor ich 1951 als Schüler in das Institut auf dem Rosenberg in St.Gallen(Schweiz) eintrat. Im Frühjahr 1955 legte ich dort die Reifeprüfung ab.

Von Sommer 1955 bis 1957 war ich Praktikant in der Engel-Apotheke in Saarbrücken. Nach bestandenem Vorexamen begann ich im WS 1955 das Studium der Pharmazie an der Universität Bonn, das ich im Herbst 1960 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen abschloß. Die Kandidatenzeit absolvierte ich in der Bahnhofs-Apotheke und der Engel-Apotheke in Saarbrücken. Die Approbation als Apotheker erhielt ich im Herbst 1961. Im Januar 1963 begann ich mit dem praktischen Teil der vorliegenden Dissertationsarbeit am Institut für Pharmakognosie der Universität des Saarlandes.

Da ich im Januar 1965 eine eigene Apotheke in Saarbrücken eröffnete, konnte ich zeitweise nur halbtags an meiner Dissertation arbeiten. Den praktischen Teil schloß ich im Sommer 1967 ab. Die vorliegende Arbeit stand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Egon Stahl.

Lebenslauf